Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, P. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, W. Wechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Zweiundvierzigster Band.

Ausgegeben am 2. Juli 1912.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1912.

UNIVERSITÄTS-BIBLIOTHEK

QP501
.B58
V.42

5

CHEMISTRY

CHEMISTRY LIBRARY

JOURNAL
Does Not Circulate

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, F. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Rechmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Zweiundvierzigster Band.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1912.

351308
QP501
.B58
v.42

INDIANA UNIVERSITY
LIBRARY

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

SPECIAL LIBRARY FUND OCT 31 1940

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Ritter, G. E. Über das Verhältnis der Schimmelpilze zum Rohrzucker 1

Rosenthal, Felix. Zur Kenntnis der hämolytischen Komponente spermotoxischer Immunsera 7

Zaleski, W. und **A. Reinhard.** Zur Frage nach dem Alkoholverbrauch bei der Pflanzenatmung 39

Wilenko, G. G. Über den Einfluß des Adrenalins auf den respiratorischen Quotienten und die Wirkungsweise des Adrenalins . . 44

Roach, Felix. Untersuchungen über die Beziehung der Geschlechtsdrüsen zum Kalkstoffwechsel 59

Pott, Paul. Die wirksame Substanz des Opiumrauches 67

Kerb, Johannes und **Paul Lazarus.** Zur Frage des Abbaues von Mononatriumurat unter dem Einfluß von Radiumemanation bzw. Radium D 82

Mondschein, Julius. Quantitative Bestimmung der Milchsäure neben β-Oxybuttersäure 91

Mondschein, Julius. Über die quantitative Bestimmung von Milchsäure bei Gegenwart von Eiweißkörpern 105

Pighini, Giacomo. Chemische und biochemische Untersuchungen über das Nervensystem unter normalen und pathologischen Bedingungen. I. Über die Indophenol-Oxydase im Zentralnervensystem, in der Tela chorioidea und in der Cerebrospinalflüssigkeit . . . 124

Pighini, Giacomo und **Pietro Barbieri.** Chemische und biochemische Untersuchungen über das Nervensystem unter normalen und pathologischen Bedingungen. II. Untersuchungen über die Katalase im Liquor cerebrospinalis 137

Pighini, Giacomo und **Flaminio Nizzi.** Chemische und biochemische Untersuchungen über das Nervensystem unter normalen und pathologischen Bedingungen. III. Aufsuchung der Esterase und der Lecithase in der normalen und pathologischen Cerebrospinalflüssigkeit 145

Loewe, Siegfried. Zur physikalischen Chemie der Lipoide. I. . . . 150

Loewe, Siegfried. Zur physikalischen Chemie der Lipoide. II. . . . 190

Loewe, Siegfried. Zur physikalischen Chemie der Lipoide. III. . . . 205

Loewe, Siegfried. Zur physikalischen Chemie der Lipoide. IV. . . . 207

Marchlewski, L. Studien in der Chlorophyllgruppe. XVI. 219

Röhmann, F. und **T. Shmamine.** Über komplexe Verbindungen von Ferrosalzen, Wasserstoffsuperoxyd und Eiweißstoffen, ein Beitrag zur Frage nach der Beteiligung des Eisens an biologischen Oxydationen 235

Seite

Böhmann, F. und **T. Shimamine.** Zur Kenntnis der Verbindungen von Ferrisalzen mit Albumosen 250
Schultz, J. H. Untersuchungen betreffend das Vorkommen eines cholesterinspaltenden Fermentes in Blut und Leber 255
Murschhauser, Hans. Ein Respirationsapparat 262
von der Heide, C. und **E. Schwenk.** Über die Bildung von flüchtigen Säuren durch Hefe bei Umgärungen von Weinen 281
Bing, H. J. und **V. Ellermann.** Ein Phosphatid als Aktivator für Tuberkulin 289
Paladino, Raffaele. Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Blutserums und des Harnes von Hunden nach Schilddrüsenexstirpation 302
Schumm, O. Die messende Spektroskopie und die Spektrophotographie als Methoden zur qualitativen Bestimmung des Oxyhämoglobins und seiner Umwandlungsprodukte 304
Caesar, Heinrich. Quantitative Untersuchung der Toxizitätsänderung des Morphins bei Kombination mit anderen Opiumalkaloiden . . 316
Palladin, W. und **N. Iwanoff.** Zur Kenntnis der gegenseitigen Abhängigkeit zwischen Eiweißabbau und Atmung der Pflanzen II. . 325
Ditz, Hugo und **Friedrich Bardach.** Über die Bestimmung von Phenol und Parakresol in ihren Gemischen 347
Murschhauser, Hans und **Hubert Hidding.** Über den Einfluß trockener und feuchter Luft auf den Gasstoffwechsel 357
Edelstein, F. und **F. v. Csonka.** Die qualitative und quantitative Bestimmung flüchtiger Fettsäuren mittels der Vakuum-Dampfdestillation 372
Fridericia, L. S. Erklärung der Versuchsergebnisse von Chauveau über die Minderwertigkeit der Fette Kohlenhydraten gegenüber als Energiespender bei Muskelarbeit 393
Bauer, J. und **St. Engel.** Studien über das Fibrinogen. I. 399
Rosenfeld, Georg. Über Glykogenbildung 403
Székely, S. Über die Fettbestimmung nach dem Prinzip der direkten Verseifung 412
Cruickshank, J. und **T. J. Mackie.** Über Änderungen der Komplement-Komponenten (Mittelstück und Endstück) durch die Einführung von Lecithin in komplementhaltiges Serum 414
Bach, A. und **V. Maryanovitsch.** Zur Kenntnis der Spezifitätserscheinungen bei der Phenolasewirkung 417
Jegorow, M. A. Zur Kenntnis der Eigenschaften des Phytins . . . 432
Endler, Josef. Über den Durchtritt von Salzen durch das Protoplasma. I. 440
Traube, J. Über die Wirkung von Basen und basischen Salzen auf Alkaloidsalze 470
Traube, J. Über die Wirkung von Natriumcarbonat auf basische Farbstoffe und deren Giftigkeit 496
Traube, J. Das Viscostagonometer. Methoden zur Bestimmung der Oberflächenspannung, Reibung und Adsorption 500
Autorenverzeichnis 504

Über das Verhältnis der Schimmelpilze zum Rohrzucker.

Von

G. E. Ritter.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des Landw. Instituts zu Nowo-Alexandria.)

(Eingegangen am 3. Mai 1912.)

Bekanntlich kann der tierische Organismus den Rohrzucker nicht als solchen assimilieren, muß ihn vielmehr zunächst unter Mitwirkung der Invertase hydrolysieren. Führt man dagegen Rohrzucker direkt in die Blutbahn unter Umgehung des Darmkanals ein, so wird er, da bei diesen Bedingungen eine Inversion unterbleibt, sozusagen als Fremdkörper mit dem Harn ausgeschieden. Was die höheren Pflanzen anbetrifft, so wird angenommen, daß der Rohrzucker darin nur als Reservestoff auftritt, daß aber seine Aufnahme durch das Plasma ebenfalls nur nach vorhergehender Inversion stattfindet. Dieser Annahme entspricht auch die allgemeine Verbreitung der Invertase in höheren Pflanzen. Weiter ist bekannt, daß die Hefe den Rohrzucker nur nach vorhergehender Inversion vergärt. Die auf Rohrzuckerlösungen gut wachsenden Schimmelpilze (Aspergillus, Penicillium, einige Mucorarten) sind ebenfalls (zum Teil kräftige) Invertinbildner.

Daß umgekehrt der Rohrzucker als solcher ohne vorhergehende Inversion nicht aufgenommen wird, hat Butkewitsch[1]) gelegentlich seiner Untersuchungen über die Eiweißzersetzung durch niedere Pilze für Rhizopus nigricans festgestellt. Dieser Pilz bildet kein Invertin; dementsprechend vermag er auch nicht auf Rohrzucker mit Ammonoxalat zu wachsen. Nimmt man aber Ammonnitrat als Stickstoffquelle, so findet

[1]) Jahrb. f. wiss. Bot. 38, 222, 1902/03.

auf Rohrzucker ein ebenso gutes Wachstum wie auf Traubenzucker statt. Das erklärt sich dadurch, daß der Pilz aus dem Ammonnitrat durch energische Ammoniakaufnahme einen Teil der Salpetersäure in Freiheit setzt[1]). Diese Salpetersäure invertiert allmählich den Rohrzucker der Kulturflüssigkeit, so daß der Pilz eigentlich nicht mehr auf Rohrzucker angewiesen bleibt, sondern direkt den Invertzucker konsumiert. Allgemeine Schlüsse können aber aus diesem Einzelfall nicht gezogen werden, um so mehr, als eine vor kurzem erschienene Arbeit von H. Pringsheim und G. Zemplén[2]) entgegengesetzte Angaben enthält. Diese Verfasser behaupten nämlich, daß gewisse Schimmelpilze (Rhizopus tonkinensis, Mucor javanicus, Penicillium purpurogenum, P. africanum, P. brevicaule) imstande sind, den Rohrzucker als Kohlenstoffquelle auszunutzen, obgleich ihnen die Fähigkeit zur Invertasebildung abgeht. Allerdings sucht man in der Arbeit vergeblich nach zahlenmäßigen Beweisen, die diese Behauptung (von der Ausnutzung des Rohrzuckers) stützen sollten. Wir erfahren nur soviel, daß diese Pilze auf Rohrzuckerlösungen mit 0,3% Ammonsulfat oder Pepton als Stickstoffquelle herangezogen wurden (S. 375 u. 376). Das Trockengewicht des Mycels ist aber nicht bestimmt worden. Nun muß aber bemerkt werden, daß schon Pepton allein auch eine mehr oder weniger gute Entwicklung der Pilze gestattet. Was das Ammonsulfat betrifft, so ist seine Anwendung gerade in diesem Falle ganz unzulässig. Denn wie Butkewitsch[3]) für Aspergillus niger und ich[4]) für verschiedene Mucoraceen zeigten, entsteht in Schimmelpilzkulturen auf Ammonsulfat freie Schwefelsäure, die den Rohrzucker natürlich invertieren muß.

Diese Erwägungen veranlaßten mich, die Frage nach der Ausnutzung des Rohrzuckers durch nicht invertierende Schimmelpilze einer erneuten Untersuchung zu unterziehen. Meine Ver-

[1]) Da Rhizopus nigricans den Nitratstickstoff gar nicht verwerten kann (vgl. meine Arbeit in Bot. Ber. 27, 582, 1910), so muß die aus dem Ammonnitrat freiwerdende HNO_3 dem aufgenommenen Ammoniak äquivalent sein. Diese Annahme trifft in der Tat zu. Die darauf bezüglichen Daten sollen demnächst veröffentlicht werden.

[2]) H. Pringsheim und G. Zemplén, Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 367, 1909.

[3]) Butkewitsch, l. c., S. 212.

[4]) G. Ritter, Botan. Ber. 27, 584, 1910.

suche bezogen sich auf Mucor spinosus, Thamnidium elegans, Rhizopus nigricans, Rhizopus tonkinensis, Mucor javanicus und Pencillium purpurogenum[1]). Zum Vergleich wurde noch der invertierende Mucor racemosus herangezogen.

Um einer Inversion des Rohrzuckers in der Kulturflüssigkeit vorzubeugen, wurde letztere auf folgende Weise bereitet: Als Kohlenstoffquelle dienten 5% Rohrzucker (in Parallelversuchen 5% Dextrose), als Stickstoffquelle 0,6% Ammontartrat oder 1% Kaliumnitrat; als Mineralsalze 0,05 $MgSO_4$ und 0,1 einer neutral reagierenden Mischung von KH_2PO_4 und K_2HPO_4. Diese Nährlösung wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 15 Minuten bei 100° sterilisiert. In allen Versuchen wurden 50 ccm Nährlösung in 200 ccm fassenden Erlenmeyerkolben genommen.

Was das Kaliumnitrat anbetrifft, so leuchtet der Vorzug dieser N-Quelle für den vorliegenden Zweck ohne weiteres ein. Leider sind aber die Rhizopus-Arten und auch Thamnidium elegans absolut unfähig, ihren Stickstoffbedarf aus dieser Quelle zu decken. Man ist deshalb gezwungen, ein Ammonsalz zu wählen. An ein Mineralsalz war nach den oben angeführten Auseinandersetzungen natürlich nicht zu denken; mir schien das Tartrat am passendsten zu sein, besonders nachdem ich mich durch Kontrollversuche überzeugt hatte, daß sämtliche Versuchsobjekte auf einer Ammontartratlösung + Mineralsalze (ohne sonstige Kohlenstoffquelle) auch nach monatelanger Kultur nur minimales Wachstum zeigen. Das Trockengewicht des Mycels betrug darauf kaum 0,001 g; das Tartrat kommt also als C-Quelle nicht in Betracht.

Die Kulturgefäße wurden nach der Aussaat der Pilzsporen (aus Agarreinkulturen) für 12 bis 16 Tage in den Thermostaten gestellt, Mucor javanicus und Rhizopus tonkinensis bei 30°, die übrigen bei 23 bis 24°.

Die herangewachsenen Pilzrasen wurden auf übliche Weise abfiltriert, gewaschen, bei 105° getrocknet und gewogen. In

[1]) Letzteres erhielt ich durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. H. Pringsheim; Rh. tonkinensis und Mucor javanicus stammten aus dem bakteriologischen Laboratorium der Technischen Hochschule in Hannover.

den untenstehenden Tabellen sind die Trockengewichte in Gramm angeführt.

Tabelle I.

Stickstoffquelle: KNO_3 (1%).

	Versuchsdauer	Saccharose 5%	Glucose 5%
Mucor spinosus	16 Tage	0,017	0,200
Mucor javanicus	16 „	0,009	0,232
Penicillium purpurogenum .	12 „	0,358	0,372
Mucor racemosus	16 „	0,172	0,196

Tabelle II.

Stickstoffquelle: Ammontartrat (0,6%).

	Versuchsdauer	Saccharose 5%	Glucose 5%
Mucor spinosus	16 Tage	0,013	0,207
Thamnidium elegans	16 „	0,010	0,171
Rhizopus nigricans	16 „	0,006	0,386
Rhizopus tonkinensis . . .	12 „	0,017	0,537
Mucor javanicus	12 „	0,018	0,201
Penicillium purpurogenum .	12 „	0,448	0,455
Mucor racemosus	16 „	0,186	0,211

Tabelle III.

Stickstoffquelle: $(NH_4)_2SO_4$ (0,66%).

	Versuchsdauer	Saccharose 5%	Glucose 5%
Mucor spinosus	16 Tage	0,076	0,064
Thamnidium elegans	16 „	0,029	0,028
Mucor javanicus	12 „	0,042	0,030
Rhizopus nigricans	16 „	0,095	0,083
Rhizopus tonkinensis . . .	12 „	0,148	0,128

Aus den beiden ersten Tabellen sehen wir, daß mit Ausnahme von Penicillium purpurogenum und Mucor racemosus alle Pilze auf Saccharose ganz minimale Ernten liefern, die hinter den auf Glucose erhaltenen um das 10 bis 20fache (und mehr) zurückbleiben. Diesen Zahlen entspricht auch die unscheinbare, geradezu spinngewebeartige Entwicklung des Mycels auf Saccharose. Es ist ohne weiteres klar, daß diese Pilze ihren Kohlenstoffbedarf aus der Saccharose eben gar nicht zu schöpfen vermögen; sie würden auf den Saccharoselösungen

überhaupt gar nicht wachsen, wenn bei der zweifachen Sterilisation nicht eine unvermeidliche geringfügige Inversion des Rohrzuckers stattfände. Dieser Schluß wird durch folgenden Versuch bewiesen:

Entfernt man das 12 bis 16tägige Mycel der obenerwähnten Pilze aus den Saccharosekulturen unter aseptischen Vorsichtsmaßregeln mit der Platinnadel und beimpft sie wieder mit Sporen derselben Art, so bleibt jede weitere Entwicklung aus. Die Kulturflüssigkeit der Saccharosekulturen enthält keine Spur von Glucose; wohl kann man aber nachweisen, daß beinahe die ganze Saccharosemenge unverbraucht geblieben ist.

Ehe wir das abweichende Verhalten des Pen. purpurogenum besprechen, wenden wir uns noch zur Tabelle III. Sie enthält die Resultate einer mit Ammonsulfat angestellten Versuchsreihe. Wie nach meinen früheren Arbeiten[1]) zu erwarten war, ist die absolute Höhe des Erntegewichts auf Ammonsulfat bei allen Pilzen eine viel geringere als auf Ammontartrat. Aber im Gegensatz zu den beiden früheren Tabellen springt hier die Tatsache in die Augen, daß die Ernten auf Saccharose denjenigen auf Glucose gar nicht nachstehen, dieselben sogar etwas übertreffen. Diese Tatsache erklärt sich sehr einfach aus der schon eingangs erwähnten, durch die Bildung freier Schwefelsäure bedingten Inversion der Saccharose. In der Tat läßt sich nach Abschluß des Versuchs in den Saccharosekulturen eine massenhafte Anhäufung von Traubenzucker nachweisen.

Was nun das Verhalten der beiden in Tabelle I und II zuletzt angeführten Pilze betrifft, so erscheint dasjenige des zum Vergleich genommenen invertinbildenden Mucor racemosus ganz natürlich. Sonderbar ist es aber, daß Penicillium purpurogenum, bei dem Pringsheim und Zemplén weder im Preßsaft noch im Mycel Invertin nachweisen konnten, auf Saccharose ganz ebensogut wie auf Glucose wächst. Dieses Resultat veranlaßte mich, die invertierende Fähigkeit des Pilzes auf einfache Weise zu prüfen. Zu diesem Zwecke wurden in größeren (300 ccm) Erlenmeyerkolben kräftige Pilzrasen herangezüchtet. Eine Kulturserie wurde auf Mannit mit Ammontartrat und Ammonphosphat, die andere auf Saccharose mit

[1]) G. Ritter, l. c.

denselben Ammonsalzen aufgestellt. Nach 8 bis 10 Tagen beträgt das Frischgewicht der kräftig wachsenden Pilzrasen in jedem Kolben ca. 1,5 g.

Die Prüfung auf Invertin wurde mit den Mannit- und Saccharosekulturen einzeln ausgeführt. In beiden Fällen wurde das Mycel (ca. 6 g Frischgewicht) gewaschen, zwischen Filtrierpapier abgepreßt, mit etwas Sand zerrieben und unter Zusatz von Toluol und 20 ccm einer 10%igen Saccharoselösung in verschlossenen Kolben 3 Tage im Thermostat bei 30° gehalten. Dann wurde die Flüssigkeit mit Natriumacetat auf dem Dampfbad erhitzt, abgesaugt, der auf dem Filter gebliebene Rückstand mehrmals mit heißem Wasser nachgewaschen und im Filtrat die Glucose nach Allihn bestimmt. Die Menge der Glucose erwies sich im ersten Falle (Mannitkultur) = 63,9 mg, im zweiten Falle (Saccharosekultur) = 150,1 mg. Es muß also auf Grund dieses Versuches angenommen werden, daß die von mir benutzte Kultur von Penicillium purpurogenum die Fähigkeit zur Inversion des Rohrzuckers besaß. Damit wäre natürlich seine Fähigkeit zu gleich gutem Wachstum auf Saccharose und Glucose (vgl. Tabelle I und II) hinreichend erklärt. Wie sich aber der Widerspruch zwischen meinen Ergebnissen und den vorhin erwähnten negativen Befunden Pringsheims und Zempléns erklären soll, entzieht sich zunächst meinem Urteil.

Aus den angeführten Versuchsergebnissen glaube ich jedenfalls schließen zu dürfen, daß in bezug auf die Fähigkeit zur Assimilation des Rohrzuckers die Schimmelpilze keine Ausnahme von der für Tiere und höhere Pflanzen bekannten Regel bilden, indem diese Fähigkeit nur den invertinbildenden Schimmelpilzen zukommt, den invertinfreien aber vollständig abgeht.

Zur Kenntnis der hämolytischen Komponente spermotoxischer Immunsera.

Von

Felix Rosenthal.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 11. April 1912.)

Die im folgenden zu schildernden Versuche bilden die Fortsetzung von bereits früher veröffentlichten Experimenten, welche an das zuerst von Morgenroth[1]) beschriebene Phänomen des Amboceptorüberganges anknüpfen. Bekanntlich ist der hämolytische Amboceptor, nachdem er von den Erythrocyten aufgenommen worden ist, nicht imstande, in nachweisbaren Mengen sich von diesen wieder abzuspalten und in das umgebende Medium überzutreten. Dagegen wird der hämolytische Immunkörper abgegeben, wenn zu den bereits sensibilisierten roten Blutkörperchen frische unbeladene Erythrocyten hinzugefügt werden. Er geht dann unter gewissen Gesetzmäßigkeiten, die Gegenstand der früheren und jetzigen Untersuchungen sind, von den mit Amboceptor beladenen roten Blutkörperchen auf die frisch hinzugefügten Erythrocyten über und kann dann nach Komplementzusatz durch die Reaktion der spezifischen Hämolyse nachgewiesen werden.

In Ergänzung der bereits vorliegenden Untersuchungen von Muir[2]), Tsuda[3]) und vor allem Philosophow[4]) haben dann Morgenroth und ich[5]) gezeigt, daß neben den Faktoren der Zeit, der Temperatur und der Beschaffenheit des Mediums für die Reversibilität der Amboceptorerythrocyten-Verbindung auch besondere Zustandsformen der reagierenden Komponenten (Amboceptoren und Receptoren), die kurz mit dem Begriff der Avidität charakterisiert worden sind, von wesentlicher Bedeutung sind.

Wir sind dann, nachdem die Reaktion des Amboceptorüberganges auf artgleiche rote Blutkörperchen einen in seinen Grundbedingungen hinreichend erforschten Prozeß darbot, im Verlaufe unserer Untersuchungen

---

[1]) Morgenroth, Über die Bindung hämolytischer Amboceptoren, Münch. med. Wochenschr. Nr. 2, S. 61. 1903.

[2]) Muir, On the act. of haemolytic. sera. Lancet 2, 446, 1903. Discuss. on immunity. Brit. med. Journ. 577, 1904.

[3]) Tsuda, Zeitschr. f. Immunitätsforschung II, 225, 1909.

[4]) Philosophow, Diese Zeitschr. 20, 292. Heft 3 bis 5. 1909.

[5]) Morgenroth und Rosenthal, I. Mitteilung. Diese Zeitschr. 36, Heft 2 bis 4, S. 190.

dazu übergegangen, durch Variation der bei der Reaktion beteiligten Elemente das Phänomen des Amboceptorüberganges einer weiteren Analyse zu unterziehen. Eine solche Variation der beim Amboceptorübergangsphänomen in Reaktion tretenden Komponenten kann sich nun entweder in der Richtung einer Substitution der Zellelemente oder des hämolytischen Immunkörpers bewegen.

So haben wir uns in unserer zweiten Mitteilung[1]) mit dem Übergang hämolytischer Amboceptoren von Organzellen (Leberzellen und Spermatozoen) auf rote Blutkörperchen beschäftigt und hierbei ausschließlich die Amboceptoren berücksichtigt, die durch Behandlung von Kaninchen mit Blutkörperchen erzeugt waren.

In diesem Falle ist die Aviditätsgröße, die der Ausdruck der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Amboceptoren und Zellreceptoren ist und somit von den individuellen Zustandsformen der Amboceptoren wie der Receptoren abhängt, im wesentlichen eine Funktion der Receptoren der jeweiligen Zellen, d. h. bei Verwendung des gleichen hämolytischen Immunkörpers wechseln die Aviditätsverhältnisse zwischen Receptoren und Amboceptoren entsprechend dem verschiedenen Receptorenapparat der verschiedenen Zellen.

Betrachtet man andrerseits die Aviditätsverhältnisse, wie sie sich bei Konstanz der Receptoren und Variation des hämolytischen Immunkörpers im Übergangsversuch ergeben, so ist es klar, daß die den Amboceptorübergang beherrschenden Momente vorzugsweise durch die individuelle chemische Konstitution des betreffenden Amboceptors, bzw. der ihn zusammensetzenden Partialamboceptoren gegeben sind. Soweit also hierbei Modalitäten beim Übergangsphänomen in die Erscheinung treten, sind sie in erster Linie auf Differenzen in der Konstitution der verschiedenen Amboceptoren zu beziehen. Inwieweit sich hieraus Kriterien für eine Differenzierung hämolytischer Amboceptoren, die durch Behandlung mit verschiedenen Zellen erzeugt sind, ergeben, haben wir in den folgenden Experimenten festzustellen versucht.

Wir beschäftigen uns in den folgenden Versuchen mit dem Übergang von hämolytischen Amboceptoren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit Widderspermatozoen gewonnen sind.

Die hämolytische Komponente von Spermatozoen-Immunsera ist zuerst von Moxter[2]) nachgewiesen worden, der zeigte, daß das Serum von mit Widderspermatozoen behandelten Kaninchen nicht unbeträchtliche hämolytische Eigenschaften auch für die Blutkörperchen des Hammels gewann.

Bereits Moxter hat die Frage gestreift, ob die durch Spermatozoenbehandlung provozierten hämolytischen Immunkörper mit den hämolytischen Amboceptoren identisch sind, die nach Injektion von Blutkörperchen

[1]) Morgenroth und Rosenthal, II. Mitteilung. Diese Zeitschr. **38**, Heft 1 und 2, S. 88, 1912.

[2]) Moxter, Deutsche med. Wochenschr. **61**, 1900.

im Serum der Versuchstiere auftreten. Moxter beobachtete, daß ein Widderspermatozoen-Immunserum, das neben seiner spezifischen Affinität zu Widderspermatozoen auch Hammelblutkörperchen zu lösen vermochte, seiner hämolytischen Fähigkeiten verlustig ging, wenn den Blutkörperchen gleichzeitig Widderspermatozoen beigemischt wurden. Den Schluß, daß der hämolytische Immunkörper im Spermatozoen-Immunserum zu homologen Spermatozoen eine größere Affinität als zu homologen roten Blutkörperchen habe, kann man jedoch auf Grund der angeführten Experimente nicht als beweiskräftig anerkennen, zumal auch vergleichende Untersuchungen über das Bindungsvermögen von Spermatozoen für hämolytische Amboceptoren, die in der üblichen Weise durch Injektion von Hammelblutkörperchen hervorgerufen werden, fehlen. Bei der von Moxter gewählten Versuchsanordnung vollzieht sich nämlich durch die Digerierung der Spermatozoen mit ihrem spezifischen Immunserum ein spezifischer Komplementbindungsprozeß, der die in den erwähnten Versuchen zur Verfügung stehende Komplementmege quantitativ beansprucht. Eine gleichzeitig stattfindende Sensibilisierung der Erythrocyten mit der hämolytischen Komponente des spermotoxischen Immunserums wird daher durch das Fehlen der zum Eintritt der Hämolyse erforderlichen Komplementmenge ohne weiteres verdeckt. Nehmen wir noch hinzu, daß nach London[1]) die Behandlung mit Spermatozoen nicht das Auftreten von Hämolysinen, sondern nur von spezifischen Hämagglutininen im Gefolge hat, und daß nach Landsteiner[2]) die Möglichkeit nicht ganz abzuweisen ist, daß die hämolytische Komponente des spermotoxischen Immunserums ihre Entstehung einer Beimengung von Erythrocyten zu der für die Immunisierung verwandten Spermatozoenemulsion verdankt, so dürften weitere Beiträge zur Frage der hämolytischen Komponente spermotoxischer Immunsera als wünschenswert erscheinen.

Unsere Versuche gehen von folgender Fragestellung aus: Bestehen für den Übergang des durch Spermatozoeninjektion erzeugten hämolytischen Amboceptors die gleichen Gesetzmäßigkeiten, wie wir sie für den Übergang der durch Blutbehandlung gewonnenen hämolytischen Immunkörper von Erythrocyten und Organzellen auf rote Blutkörperchen feststellen konnten, oder durch welche Charakteristika läßt sich der durch Spermatozoeninjektion erzeugte hämolytische Amboceptor gegen den durch Behandlung mit roten Blutkörperchen gewonnenen Amboceptor abgrenzen?

Zur Technik unserer Versuche haben wir folgendes vorauszuschicken:

---

[1]) London, Contr. à l'ét. des spermolysines I, II. Arch. scienc. biol. St. Pétersb. 9, 84, 1901.

[2]) Landsteiner, Immunität gegen Körperzellen und Neubildungen. Handb. d. Biochem. Herausgegeben von Oppenheimer. 2, 1, 546, 1910.

Die Spermatozoenaufschwemmung gewannen wir wie in unseren früheren Experimenten dadurch, daß wir den Nebenhoden von Widdern fein zerschnitten, die Gewebsstücke mit physiologischer Kochsalzlösung in der Reibschale auspreßten und die so gewonnenen Zellen mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung wuschen. Bei vorsichtiger Abpräparierung des Nebenhodens vom Hoden gelingt es unschwer, eine Spermatozoenaufschwemmung zu erhalten, die nur wenig Blutkörperchen enthält. Um letztere nach Möglichkeit noch zu entfernen, wurde die Spermatozoenaufschwemmung scharf zentrifugiert, worauf ein großer Teil der vorhandenen Erythrocyten sich als feines rotes Sediment am Boden des Zentrifugierröhrchens ansammelt. Durch Benutzung der oberen Schichten dieses Spermatozoenzentrifugates erhält man alsdann eine von Erythrocyten fast freie Spermatozoenemulsion. Der so stets frisch aus je 6 Widdernebenhoden hergestellte Zellbrei wurde nun je einem Kaninchen intraperitoneal injiziert und nach 8 Tagen die Injektion in der gleichen Weise wiederholt. Nach weiteren 8 Tagen wurden dann nach vorangegangener Stichprobe (durch Blutentnahme aus der Ohrvene) die Tiere entblutet, bzw. einer erneuten gleichartigen Spermatozoenbehandlung unterzogen. Wir erhielten auf diese Weise nach 2, resp. 3 intraperitonealen Spermainjektionen spermotoxische Immunsera, welche in Übereinstimmung mit den Angaben von Moxter stets auch ein nicht unbeträchtliches spezifisches Lösungsvermögen für Hammelblutkörperchen aufwiesen. Die Immunsera wurden durch halbstündiges Erwärmen im Wasserbade bei 56° inaktiviert und im Eisschranke bei ca. 8° aufbewahrt. Vor jedem Experiment wurde die einfach lösende Dosis des Amboceptors = Amboceptoreinheit für Hammelblut festgestellt. Als Komplement diente frisches Meerschweinchenserum.

Wir beschäftigen uns im folgenden zunächst mit dem Übergang dieser hämolytischen Spermatozoen-Kan.-Amboceptoren von Erythrocyten auf rote Blutkörperchen der gleichen Art.

A. Übergang von Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren von homologen und heterologen Erythrocyten auf homologe Blutkörperchen.

Bezüglich des Überganges von durch Blutbehandlung erzeugten Amboceptoren zwischen artgleichen Erythrocyten hatte Philosophow in Übereinstimmung mit den früheren Angaben von Muir gefunden, daß von den abgebenden Blutkörperchen sechs Amboceptoreinheiten gebunden sein müssen, wenn an die neu zugefügte gleiche Menge von Erythrocyten eine volle Amboceptoreinheit abgegeben werden soll. Morgenroth u. Rosenthal hatten alsdann in ihrer I. Mitteilung diese Befunde dahin ergänzen können, daß beim Übergang des Blut-Kan.-Amboceptors auf frisches Blut die Individualität des Amboceptors eine wesentliche Rolle

spielt, und daß einerseits bei vereinzelten Amboceptoren bereits bei ursprünglicher Bindung von 2 Einheiten der Amboceptorübergang sich vollziehen kann, daß andererseits aber auch bei ursprünglicher Bindung von 12, bzw. 10 Amboceptoreinheiten der Übergang einer Einheit auf frisch hinzugefügtes Blut ausbleiben kann. Bei unseren Versuchen, Grundgesetze für den Übergang hämolytischer Spermatozoen-Kan.-Amboceptoren zwischen artgleichen roten Blutkörperchen zu fixieren, sind wir nun auf ähnliche Phänomene gestoßen, die eine pluralistische Auffassung auch der Spermatozoen-Kan.-Amboceptoren nahelegen. Wir führen in dieser Richtung folgende Versuche als Beispiele an.

Versuch 1.

(7. XII. 1911.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amb. von Ziegenblut auf Ziegenblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amb. vom 26. XI. 11 (Nr. 14). Lösende Dosis = Amboceptoreinheit für 1 ccm 5%iges Ziegenblut 0,008 bei 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement.

Je 1 ccm 5%iges Zg.-Blut, Gesamtvolumen 2,0 ccm.

Mengen des Widderspermatozoen-Kan.-Amb.	Zahl der Amboceptoreinheiten
1. 0,4 1/10	5
2. 0,48 1/10	6
3. 0,8 1/10	10
4. 0,12	15
5. 0,16	20

Nach einstündigem Verweilen im Brutschranke bei 37° wurden die Röhrchen zentrifugiert, das Sediment mit reichlich physiologischer Kochsalzlösung einmal gewaschen. Zum Sediment werden alsdann 1 ccm physiologische Kochsalzlösung und ferner 1 ccm frischen, 5%igen Ziegenblutes hinzugefügt, Gesamtvolumen 2,0 ccm. Die Röhrchen bleiben unter ständigem Schütteln 1 Stunde lang bei 40° im Wasserbad.

Nun wird jedem Röhrchen die Hälfte seines Inhaltes entnommen = 1,0 ccm, und entsprechend der Blutmenge 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement zugesetzt. Hierauf 2 Stunden bei 37° und Eisschrank bis zum folgenden Tage.

Zur Kontrolle der Bindung des Amboceptors an die abgebenden Blutkörperchen wird der Abguß in folgenden Mengen untersucht:

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von				
	5 l. D.	6 l. D.	10 l. D.	15 l. D.	20 l. D.
0,4	0	0	—	—	—
0,2	—	—	0	0	0
0,1	—	—	—	0	0

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Kompl.-Zusatz von 0,1 ccm Hämolyse:	
1	5	f. kompl. neue Hämolyse	ohne Kompl.
2	6	kompl.	0
3	10	„	
4	15	„	
5	20	„	

1,0 ccm 5%iges Ziegenblut + 0,1 ccm Meerschw.-Serum: 0.

Versuch 2.

(18. XII. 1911.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Ziegenblut auf Ziegenblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor vom 26. XI. 1911. Lösende Dosis für Ziegenblut 0,025.

Versuchsanordnung wie Versuch 1.

Mengen des Widder-spermatozoen-Kan.-Amboc.	Zahl der Amboceptoreinheiten
1. 1,0 1/10	4
2. 0,15	6
3. 0,25	10
4. 0,3	12

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von			
	4 l. D.	6 l. D.	10 l. D.	12 l. D.
0,5	0	0	—	—
0,4	—	—	0	0
0,2	—	—	0	0
0,1	—	—	—	0

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:	Ohne Kompl. Hämolyse:
1	4	starke neue Hämolyse	0
2	6	kompl.	
3	10	„	
4	12	„	

1,0 ccm 5%iges Ziegenblut + 0,1 ccm Meerschw.-Serum: 0.

Versuch 3.

(26. XI. 1911.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Hammelblut auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor vom 25. XI. 1911. Lösende Dosis für Hammelblut 0,005.

Versuchsanordnung wie bisher.

Mengen des Widder-spermatozoen.-Kan.-Amboc.	Zahl der Amboceptoreinheiten
1. 0,5 $^1/_{10}$	10
2. 1,0 $^1/_{10}$	20
3. 0,15	30
4. 0,2	40

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von 10 l. D.	20 l. D.	30 l. D.	40 l. D.
0,5	fast 0	—	—	—
0,2	„ 0	fast 0	—	—
0,1	—	„ 0	fast 0	Zone
0,05	—	—	„ 0	Zönchen

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:	Ohne Kompl. Hämolyse:
1	10	f. kompl. neue Hämolyse	0
2	20	kompl.	
3	30	„	
4	40	„	

1,0 ccm 5%iges Hammelblut + 0,1 ccm Meerschw.-Serum: fast 0.

Versuch 4.

(27. XI. 1911.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Hammelblut auf Hammelblut.

Versuch mit demselben Amboceptor wie im vorangehenden Experiment, nur verschiedene Dosierung. Sonst gleiche Versuchsanordnung. Lösende Dosis für Hammelblut: 0,005.

Je 2,0 ccm 5%iges Hammelblut, Gesamtvolumen 3,0 ccm.

Mengen des Widder-spermatozoen-Kan.-Amboc.	Zahl der Amboceptoreinheiten
1. 0,4 $^1/_{10}$	4
2. 0,6 $^1/_{10}$	6
3. 1,0 $^1/_{10}$	10
4. 0,12	12
5. 0,15	15

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von 4 l. D.	6 l. D.	10 l. D.	12 l. D.	15 l. D.
0,5	Spur	Spur	—	—	—
0,25	„	„	Spur	Spur	Spur
0,2	—	„	„	„	„
0,1	—	—	„	„	„

Zum Sediment werden 2,0 ccm 0,85%ige NaCl-Lösung hinzugefügt + 2 ccm 5%igen frischen Hammelblutes. Sämtliche Röhrchen bleiben 1 Stunde bei 40° im Wasserbade. Alsdann werden aus jedem Röhrchen je 2 ccm entnommen und mit 0,2 ccm Meerschw.-Serum digeriert.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,2 ccm Hämolyse:	Ohne Kompl. Hämolyse:
1	4	mäßige neue Hämolyse	0
2	6	starke neue Hämolyse	
3	10	f. kompl. neue Hämolyse	
4	12	kompl.	
5	15	„	

1 ccm 5%iges Hammelblut + 0,1 ccm Meerschw.-Serum: Spur.

Versuch 5.

(27. I. 1912.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Hammelblut auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor Ia vom 24. I. 1912. Lösende Dosis für Hammelblut 0,03.

Versuchsanordnung wie Versuch 1.

Mengen des Widder-spermatozoen-Kan.-Amboc.	Zahl der Amboceptoreinheiten
1. 0,6 1/10	2
2. 0,12	4
3. 0,18	6
4. 0,3	10

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von 2 l. D.	4 l. D.	6 l. D.	10 l. D.
1,0	mäßig	mäßig	—	—
0,5	—	schwach	schwach	schwach
0,3	—	—	„	„
0,2	—	—	—	Spur

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:	Ohne Kompl. Hämolyse:
1	2	starke neue Hämolyse	0
2	4	kompl.	
3	6	„	
4	10	„	

1 ccm 5%iges Hammelblut + 0,1 ccm Meerschw.-Serum: Spur.

Wenn wir die Resultate dieser Versuche 1 bis 5 überblicken, so geht zunächst aus ihnen hervor, daß der bei der Spermatozoenbehandlung auftretende hämolytische Amboceptor eine beträchtliche Avidität zu homologen Erythrocyten besitzt. So werden in Versuch 1 und 3 von den Hammelblutkörperchen dargebotenen Amboceptormengen sämtliche 20, bzw. 40 Einheiten voll gebunden, und ebenso erfolgt in Versuch 2, 4 und 5 eine vollständige Bindung der maximal zur Verfügung stehenden 12, 15 und 10 Amboceptoreinheiten.

Was die Bedingungen des Überganges dieser Spermatozoen-Kan.-Amboceptoren von homologem auf homologes Blut betrifft, so ist weiter aus den Versuchen ersichtlich, daß in Analogie zu unseren Erfahrungen bei hämolytischen Blut-Kan.-Amboceptoren auch für den Übergang der Spermatozoen-Kan.-Amboceptoren zwischen artgleichen Blutkörperchen keine zahlenmäßig ausdrückbaren Gesetzmäßigkeiten bestehen. Wohl sehen wir auch hier in Versuch 1 und 2, daß die 6-Zahl ursprünglich gebundener Einheiten die Voraussetzung für den Übergang einer Amboceptordosis auf das frisch hinzugefügte Blut bildet, dagegen ist jedoch aus den anderen 3 Versuchen zu ersehen, daß der Übergang des Amboceptors sich auch bei ursprünglicher Bindung von 4 Einheiten vollziehen kann (Versuch 5), daß andererseits, wie Versuch 3 und 4 demonstriert, auch bei ursprünglicher Bindung von 10 Amboceptoreinheiten der Übergang einer Einheit auf frisch hinzugefügtes Blut ausbleiben kann. Es ergibt sich somit, daß auch beim Übergang von Spermatozoen-Kan.-Amboceptoren von Blutkörperchen auf Blutkörperchen die Individualität des Amboceptors eine wesentliche Rolle spielt.

Soweit also das Phänomen des Amboceptorüberganges von homologen auf homologe Erythrocyten in Betracht kommt, bestehen somit zwischen den hämolytischen, durch Blutbehandlung erzeugten Amboceptoren und der hämolytischen Komponente spermotoxischer Immunsera keine markanten Differenzen.

Wir gingen in unseren weiteren Experimenten nun dazu über, die hämolytischen Funktionen der Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren für heterologe Blutkörperchen zu untersuchen.

Die Regel für durch Blutbehandlung gewonnene Amboceptoren ist bekanntlich die, daß die Amboceptoren eine geringere hämolytische Fähigkeit heterologen Erythrocyten gegenüber besitzen als homologen, und zwar geht aus dem großen Material von Ehrlich und Morgenroth, mit dem die Versuche von Philosophow und unsere eignen Beobachtungen im Einklang stehen, hervor, daß die hämolytisch wirksame Dosis eines Blut-Amboceptors für heterologes Blut das $1^1/_2$fache bis 33fache der Einheit für die homologe Blutart beträgt. In allen diesen Versuchen handelte es sich um das Verhalten von Ziegen-Kan.-Amboceptoren und Rinder-Kan.-Amboceptoren gegenüber Ziegen- und Rinderblutkörperchen.

Wir konnten nun bei unseren sämtlichen 5 Widderspermatozoen-Kan.-Ambocept. feststellen, daß ihnen die Fähigkeit, Rinderblutkörperchen in nennenswerter Weise zu lösen, fehlte. Selbst bei Darbietung von 150 Einheiten für Hammelblut trat keine Hämolyse der Rinderblutkörperchen ein. Damit ergibt sich eine Differenz zwischen den hämolytischen Amboceptoren, die durch Behandlung mit Blutkörperchen oder durch Spermatozoen der gleichen Tierart erzeugt sind. Nur den Blut-Kan.-Amboceptoren kommen hämolytische Eigenschaften auch heterologen Blutkörperchen gegenüber zu, während die hämolytische Komponente spermotoxischer Immunsera ihre globulicide Wirkung nur auf artgleiche Erythrocyten im allgemeinen auszuüben scheint.

Bei dem Fehlen der hämolytischen Eigenschaften unserer Widderspermatozoen-Kan.-Immunsera für Rinderblutkörperchen und in Analogie zu den Beobachtungen Ehrlichs und Morgenroths[1]) an Blut-Kan.-Amboceptoren war es von vornherein wahrscheinlich, daß, wenn überhaupt, das Bindungsvermögen von Rinder-Erythrocyten für die Hammelblut lösenden Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren nur ein sehr geringes sein würde. Unter dieser Voraussetzung einer nur in geringem Maße zwischen Rinder-Erythrocyten und Widderspermatozoen-

[1]) Ehrlich und Morgenroth, Über Hämolysine. Berl. klin. Wochenschr. **1901**, Nr. 21, S. 569; Nr. 22, S. 598.

Kan.-Amboceptor stattfindenden Bindung war es nun weiter zu erwarten, daß mit der geringen Avidität der miteinander reagierenden Komponenten auch eine beträchtliche Reversibilität der Amboceptor-Receptor-Verbindung einhergehen würde in Analogie zu den Versuchsergebnissen von Morgenroth und Rosenthal, II. Mitteilung, beim Übergang hämolytischer Amboceptoren von Organzellen auf Erythrocyten. Das Maß dieses Amboceptor-Überganges mußte alsdann, sofern hier allgemeine Gesetzmäßigkeiten bestehen, auch in dem vorliegenden Falle bestimmt werden durch die Konkurrenz der in Aktion tretenden Aviditäten, wie sie sich mit der Verwendung heterologer und homologer Zellen ergeben, und um so größer sein, je geringer die Avidität der abgebenden heterologen Zellelemente und je größer die Avidität der aufnehmenden homologen Zellen zum hämolytischen Amboceptor ist. Mit anderen Worten: Es mußte erwartet werden, daß der Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Rinderblutkörperchen auf Hammelblutkörperchen sich ganz besonders leicht vollziehen werde. Daß diese Voraussetzungen zu Recht bestehen, dafür liefern die folgenden Versuche den Beweis.

Die Versuchstechnik ist die in dem folgenden Experiment 6 näher beschriebene. Da, wie oben ausgeführt wurde, die Rinderblutkörperchen durch Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren im komplementhaltigem Medium keine Auflösung erfahren, so sahen wir uns zur Beurteilung des Grades der Hämolyse genötigt, die colorimetrische Methode heranzuziehen. Wir benutzten als Standardlösung eine stets frisch bereitete 5%ige Hämoglobinlösung, die durch entsprechende Auflösung von Blut in destilliertem Wasser hergestellt wurde.

Versuch 6.

(23. I. 1912.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Rinderblut auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor (Nr. 14). Lösende Dosis für Hammelblut 0,025 ccm.

Es wird folgende Reihe von Röhrchen angesetzt:

Menge des 5%igen Rinderblutes	Menge d. Widdersperm.-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösg.	Zahl der Einheiten für Hammelblut
1. 1,0 ccm	0,25 1/10	0,75	1
2. 1,0 „	0,5 1/10	0,5	2
3. 1,0 „	1,0 1/10	—	4
4. 1,0 „	0,15	0,85	6
5. 1,0 „	0,2	0,8	8

1 Stunde im Brutschrank bei 37°. Die Röhrchen werden zentrifugiert, das Sediment mit reichlich physiologischer Kochsalzlösung einmal gewaschen.

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse von Hammelblut bei Darbietung von ursprünglich 1 l. D.	2 l. D.	4 l. D.	6 l. D.	8 l. D.
1,0	schwach	stark	kompl.	—	—
0,5	—	—	st.-mäßig	f. kompl.	kompl.
0,3	—	—	—	stark	stark
0,2	—	—	—	—	st.-mäßig

Zum Sediment werden alsdann 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 1 ccm frischen 5%igen Hammelblutes hinzugefügt, Gesamtvolumen 2 ccm. Die Röhrchen bleiben unter ständigem Schütteln eine Stunde lang bei 40° im Wasserbad.

Weitere Behandlung wie in Versuch 1.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:
1	1	Rd.-Blut-Sediment, kpl. Hämol. d. H.-Blutes
2	2	„ „ „ kpl.
3	4	„ „ „ „
4	6	„ „ „ „
5	8	„ „ „ „

1 bis 5 ohne Komplement: 0.

0,5 ccm Rinderblut + 0,1 ccm M.-S.: Spürchen.

0,5 ccm Hammelblut + 0,1 ccm M.-S.: Spürchen.

Versuch 7.

(24. I. 1912.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Rinderblut auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor vom 25. XI. 1911 (Nr. 13). Lösende Dosis für Hammelblut 0,005 ccm.

Es wird folgende Reihe von Röhrchen angesetzt.

	Menge des 5%igen Rinderblutes	Menge d. Widdersperm.-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösg.	Zahl der Einheiten für Hammelblut
1.	1,0 ccm	$0{,}5\,^{1}/_{100}$	0,5	1
2.	1,0 „	$0{,}15\,^{1}/_{10}$	0,85	3
3.	1,0 „	$0{,}25\,^{1}/_{10}$	0,75	5
4.	1,0 „	$0{,}35\,^{1}/_{10}$	0,65	7

Versuchsanordnung wie Versuch 6.

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse von Hammelblut bei Darbietung von 1 l. D.	3 l. D.	5 l. D.	7 l. D.
2,0	mäßig	—	—	—
0,7	—	mäßig-stark	kompl.	kompl.
0,4	—	—	st. f. kompl.	„
0,3	—	—	—	stark

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:
1	1	Rd.-Blut-Sediment, wohl kpl. Hämol. d. H.-Blutes
2	3	„ „ „ kpl.
4	5	„ „ „ „
5	7	„ „ „ „

1 bis 4 ohne Komplement: 0.

0,5 ccm Rinderblut + 0,1 ccm M.-S.: Spur.

0,5 ccm Hammelblut + 0,1 ccm M.-S.: Spur.

Versuch 8.

(27. I. 1912.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Rinderblut auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor Ia vom 24. I. 1912. Lösende Dosis für Hammelblut 0,03 ccm.

Versuchsanordnung wie bei Versuch 6.

Es wird folgende Reihe von Röhrchen angesetzt.

Menge des 5%igen Rinderblutes	Menge d. Widdersperm.-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösg.	Zahl der Einheiten für Hammelblut
1. 1,0 ccm	0,3 1/10	0,7	1
2. 1,0 „	0,9 1/10	0,1	3
3. 1,0 „	0,15	0,85	5
4. 1,0 „	0,21	0,79	7

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse von Hammelblut bei Darbietung von 1 l. D.	3 l. D.	5 l. D.	7 l. D.
2,0	mäßig	—	—	—
0,7	—	mäßig	f. g. kpl.	kpl.
0,4	—	—	mäßig	st. — fast kpl.
0,3	—	—	—	mäßig

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:
1	1	Rd.-Blut-Sediment, kpl. Hämol. d. H.-Blutes
2	3	„ „ „ kpl.
3	5	„ „ „ „
4	7	„ „ „ „

1 bis 4 ohne Komplement: 0.

0,5 ccm Rinderblut + 0,1 ccm M.-S.: fast 0.

0,5 ccm Hammelblut + 0,1 ccm M.-S.: fast 0.

Es geht aus den angeführten Versuchen hervor, daß Rinderblutkörperchen Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren zu verankern vermögen, daß aber das Bindungsvermögen der Rinderblutreceptoren für diese auf Hammelblut wirkenden Amboceptoren sehr gering ist. So werden in Versuch 6 von 4 Einheiten für Hammelblut und in Versuch 7 und 8 von 5 dargebotenen Amboceptoreinheiten nur 2 von den Rindererythrocyten beansprucht. Es besteht somit zwischen heterologen Blutzellen und Spermatozoen-Kan.-Amboceptoren eine sich in dem Bindungsvermögen beider Komponenten manifestierende sehr geringe Affinität. Bei der großen Avidität der Spermatozoen-Amboceptoren zu den Receptoren homologer Erythrocyten, wie sie in unseren zu Anfang wiedergegebenen Versuchen 1 bis 5 hervortritt, gelingt es dann leicht, die nur in lockerer Bindung bestehende Vereinigung des Amboceptors mit den Receptoren der heterologen Blutkörperchen zu sprengen. Entsprechend der erheblichen Reaktionstendenz der homologen Blutreceptoren findet daher eine Überwanderung des Amboceptors von Rinderblut auf Hammelblut statt. So erklärt es sich, daß eine Desensibilisierung der Rindererythrocyten stattfindet und selbst eine von den Rinderblutkörperchen ursprünglich gebundene Amboceptordosis auf die Hammelblutköperchen übergeht.

Es stimmen auch diese Befunde mit den Modalitäten des Überganges der auf Hammelblut gerichteten Partialamboceptoren der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren von Rinderblut auf Hammelblut überein, wie dies die folgenden Versuche illustrieren.

Versuch 9.

(4. III. 1912.)

Übergang des Hammelblut-Kan.-Amboceptors von Rinderblut auf Hammelblut.

Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom 18. I. 1912. Lösende Dosis für 1 ccm 5%iges Hammelblut 0,0003, für Rinderblut 0,002.

Versuchsanordnung wie in Versuch 6.

Es wird folgende Reihe von Röhrchen angesetzt:

	Menge des 5%igen Rd.-Blutes ccm	Menge des Hammelblut-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösung	Zahl der Einheiten für Hammelblut	Zahl der Einheiten für Rd.-Blut
1.	1,0	$0{,}3\,^1/_{1000}$	0,7	1	0
2.	1,0	$0{,}6\,^1/_{1000}$	0,4	2	0
3.	1,0	$0{,}9\,^1/_{1000}$	0,1	3	0
4.	1,0	$0{,}12\,^1/_{100}$	0,88	4	0

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse von Hammelblut bei Darbietung von ursprünglich 1 l. D. für Hammelblut	2 l. D. für Hammelblut	3 l. D. für Hammelblut	4 l. D. für Hammelblut
2,0	fast 0	—	—	—
1,0	—	mäßig	f. kompl.	f. g. kompl.
0,7	—	schwach	mäßig	—
0,5	—	—	—	mäßig stark

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten für Hammelblut	Bei Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:
1	1	Rd.-Blut-Sediment, kpl. Hämol. d. H.-Blutes
2	2	„ „ „ kpl.
3	3	„ „ „ „
4	4	„ „ „ „

1 bis 4 ohne Komplement: 0.

1 ccm Rinderblut + 0,1 Kompl.: Spur.

1 ccm Hammelblut + 0,1 Kompl.: Spur.

Versuch 10.

(5. III. 1912.)

Übergang des Hammelblut-Kan.-Amboceptors von Rinderblut auf Hammelblut.

Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom 30. I. 1912. Lösende Dosis für Hammelblut 0,000025, für Rinderblut 0,00075.

Versuchsanordnung wie in Versuch 6.

Es wird folgende Reihe von Röhrchen angesetzt:

	Menge des 5%igen Rd.-Blutes ccm	Menge des Hammelblut-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösung	Zahl der Einheiten für Hammelblut	Zahl der Einheiten für Rd.-Blut
1.	1,0	$0{,}25\,^1/_{10000}$	0,75	1	0
2.	1,0	$0{,}5\,^1/_{10000}$	0,5	2	0
3.	1,0	$0{,}75\,^1/_{10000}$	0,25	3	0
4.	1,0	$1{,}0\,^1/_{10000}$	—	4	0

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse von Hammelblut bei Darbietung von ursprünglich 1 l. D. für Hammelblut	2 l. D. für Hammelblut	3 l. D. für Hammelblut	4 l. D. für Hammelblut
2,0	schwach	—	—	—
1,0	—	mäßig	stark	f. kompl.
0,7	—	schwach	stark-mäßig	—
0,3	—	—	—	mäßig-stark

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten für Hammelblut	Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse
1	1	Rd.-Blut-Sediment, kpl. Hämol. d. H.-Blutes
2	2	„ „ „ kpl.
3	3	„ „ „ „
4	4	„ „ „ „

1 bis 4 ohne Komplement: 0.
1 ccm Rinderblut + 0,1 Kompl.: fast 0.
1 ccm Hammelblut + 0,1 Kompl.: fast 0.

Wie eine Betrachtung der Versuche 9 und 10 zeigt, existieren zwischen den Receptoren der Rinderblutkörperchen und Hammelblut-Kan.-Amboceptoren, sofern deren Einstellung sich auf Hammelblutkörperchen bezieht, gleichfalls nur geringe chemische Affinitäten. So ist aus den Protokollen zu entnehmen, daß von 4 Amboceptoreinheiten für Hammelblut nur 2 Einheiten von den Rinderblutkörperchen verankert werden. So vollzieht sich denn auch hier der Amboceptorübergang von Rinderblut auf Hammelblut bereits bei ursprünglicher Bindung von einer Einheit für Hammelblut an die Rindererythrocyten, so daß eine Amboceptorentladung der Rinderblutkörperchen stattfindet. Auch hier ist es wieder das Prinzip der konkurrierenden Aviditäten, das ein Verständnis der Mannig-

faltigkeit der Austauschprozesse zwischen den Zellen ermöglicht. Wir müssen uns demnach vorstellen, daß sowohl Blut- wie Spermatozoen-Amboceptoren beträchtliche chemische Verwandtschaftsbeziehungen zu ihren homologen Erythrocyten aufweisen und daß die nämlichen Amboceptoren in ihren auf Hammelblut gerichteten hämolytischen Komponenten auch darin übereinstimmen, daß ihre Reaktionstendenz zu den Receptoren der Rinderblutkörperchen über einen sehr geringen Grad nicht hinausgeht.

Wir möchten beiläufig erwähnen, daß entsprechend der pluralistischen Anschauung Ehrlichs und Morgenroths, wonach die lösende Wirkung von Hammelblut-Kan.-Amboceptoren auf Hammelblut und Rinderblut auf zwei differenten Fraktionen von Immunkörpern im Serum beruht, wir auch im Übergangsphänomen charakteristische Differenzen feststellen konnten, je nachdem wir den Übergang der auf Hammelblut oder auf Rinderblut wirkenden Fraktion des Hammelblut-Kan.-Amboceptors von Rinderblut auf Hammelblut beobachteten. Die nebenstehende Tabelle möge hierüber kurz orientieren.

Es ist aus der Tabelle ohne weiteres ersichtlich, daß die auf Rinderblut wirkende Fraktion der

Tabelle XI.

Übergang der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren von Rinderblut auf Hammelblut.

Hammelblut-Kan.-Amboceptor vom	Amboceptoreinheit für Hammelblut	Amboceptoreinheit für Rinderblut	Die Rinderblutkörperchen bei Darbietung von Hammelblutteinheiten binden von 1 1. D.	2 1. D.	3 1. D.	4 1. D.	geben 1 Einheit ab bei ursprünglicher Bindung von	bei Darbietung von Rinderblutteinheiten binden von 2 1. D.	4 1. D.	6 1. D.	10 1. D.	geben 1 Einheit ab bei ursprünglicher Bindung von
18. I. 1912	0,0003	0,002	1	< 2	2	> 2	1 Einheit	2	4	6	9	3 Einheiten
30. I. 1912	0,000025	0,00075	1	< 2	2	> 2	1 Einheit	2	> 3	5	> 6	6 Einheiten

Hammelblut-Kaninchen-Amboceptoren entsprechend ihrem beträchtlicheren Bindungsvermögen auch weniger leicht abgegeben wird. So erfolgt in dem einen Falle der Amboceptorübergang auf Hammelblutkörperchen bei ursprünglicher Bindung von 3 Einheiten an die Rinderblutkörperchen, in dem anderen Falle bei ursprünglicher Bindung von 6 Einheiten.

Es läßt somit auch das Phänomen des Amboceptorüberganges von heterologen auf homologe Erythrocyten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den hämolytischen, durch Blutbehandlung erzeugten Amboceptoren und der hämolytischen Komponente spermotoxischer Immunsera erkennen.

B. Übergang der Widderspermatozoen-Kaninchenamboceptoren von homologen und heterologen Spermatozoen auf homologe Erythrocyten.

Wir haben in dem vorangehenden Kapitel A gezeigt, daß bei dem Phänomen des Amboceptorüberganges von homologen und heterologen Erythrocyten auf artgleiche rote Blutkörperchen keine prinzipiellen Differenzen zwischen den auf Hammelblut wirkenden hämolytischen Komponenten der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren und Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren bestehen. Wir sind nun in unseren weiteren Versuchen dazu übergegangen, die Verwandtschaftsbeziehungen der Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren in ihrem Verhältnis zum Receptorenapparat homologer und heterologer Spermatozoen einer experimentellen Analyse zu unterziehen. Wir haben bereits oben erwähnt, daß den in dieser Richtung vorliegenden Untersuchungen Moxters eine Beweiskraft nicht zuerkannt werden kann, da der in den genannten Experimenten interferierende Komplementbindungsprozeß unberücksichtigt geblieben ist. Für eine eingehende Untersuchung derartiger, die Aviditätszustände der Spermatozoen und Erythrocyten zu ihren Amboceptoren betreffender Fragen erscheint die Methodik des Amboceptorüberganges besonders geeignet, da Aviditätsdifferenzen in dem Maß und der Richtung des Amboceptorüberganges ihren charakteristischen Ausdruck finden. Es war daher unter der hypothetischen Voraussetzung einer Differenz der hämolytischen

Komponenten für Hammelblut bei Hammelblut- und Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren zu erwarten, daß der Amboceptorübergang von Spermatozoen auf Blutkörperchen sich bei einer Wesensverschiedenheit der betreffenden hämolytischen Amboceptoren unter verschiedenen Modalitäten vollziehen werde.

Dem Nachweis des Überganges des Spermatozoen-Kan.-Amboceptors von Widderspermatozoen auf Hammelblutkörperchen stellten sich beträchtliche experimentelle Schwierigkeiten entgegen, da der bei Sensibilisierung der Spermatozoen mit ihrem homologen Spermatozoen-Immunserum stattfindende spezifische Komplementbindungsprozeß außerordentlich störend interferierte. Wir bestimmten daher vor jedem Experiment diejenige Komplementmenge, die bei Anwesenheit von 1 ccm einer 10%igen Widderspermatozoenaufschwemmung, die mit der im Hauptversuch verwendeten höchsten Amboceptormenge sensibilisiert war, noch 1 ccm einer einfach sensibilisierten 5%igen Hammelblutsuspension zu lösen vermochte. Um hämolytische Einflüsse von seiten der Spermatozoen im Sinne der Korschun-Morgenrothschen Organextrakthämolyse beim Übergangsversuch auszuschalten, setzten wir zum Sediment der sensibilisierten, gewaschenen Spermatozoen auf 65° erhitztes, mit 0,85%iger Kochsalzlösung 5fach verdünntes Menschenserum hinzu. Im übrigen blieb die Technik dieser Versuche die gleiche wie die unserer Spermatozoen-Versuche in der II. Mitteilung[1]).

In einer anderen Versuchsreihe suchten wir den bei der Beurteilung des Amboceptorüberganges störenden Faktor der spezifischen Komplementbindung in der Weise zu eliminieren, daß wir durch Filtration die Spermatozoen und Erythrocyten nach ihrem 1stündigen Aufenthalte im Wasserbade bei 40° trennten, was durch Anwendung der Filter Nr. 602 (hart) von Schleicher & Schüll in einer den Versuchsbedingungen genügenden Weise geschah. Über Einzelheiten dieser Versuchsanordnung geben die einschlägigen Protokolle nähere Auskunft.

Wir geben im folgenden unsere Versuchsprotokolle wieder:

---

[1]) l. c.

Versuch 12.

(3. XII. 1911.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Widderspermatozoen auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor Nr. 13 vom 25. XI. 1911. Lösende Dosis für Hammelblut: 0,02.

Widderspermatozoen vom 2. XII. 1911. 10%, 1 ccm.

Es werden folgende Röhrchen angesetzt:

Je 1 ccm Widderspermatozoen.

Gesamtvolumen 3,0 ccm.

Mengen des Widderspermatozoen-Kan.-Amboc.	Zahl der Einheiten
1. 0,8 1/10	4
2. 0,12	6
3. 0,16	8
4. 0,2	10
5. 0,4	20

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich				
	4 l. D.	6 l. D.	8 l. D.	10 l. D.	20 l. D.
1,5	0	0	0	0	—
0,75	0	—	0	0	0
0,5	—	0	0	0	0
0,3	—	—	—	0	0
0,15	—	—	—	—	0

Zu den Sedimenten der so mit Amboceptor beladenen Widderspermatozoen wird nun nach einmaliger Waschung mit reichlich physiologischer Kochsalzlösung 1 ccm 1/5 Menschenserum (1/2 Stunde bei 65° erhitzt) und 1 ccm 5%iges Hammelblut hinzugefügt. Die Röhrchen bleiben unter häufigem Schütteln 1 Stunde bei 40° im Wasserbade.

Nun wird jedem Röhrchen die Hälfte seines Inhaltes = 1 ccm entnommen und 0,3 ccm Meerschweinchenserum hinzugefügt, eine Menge, die gerade noch ausreicht, um bei 1stündigem Kontakt mit 1 ccm 20fach sensibilisierten Widderspermatozoen und 1 ccm 1fach sensibilisierten 5%igen Hammelblutes eine komplette Hämolyse zu bewirken.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,3 ccm. Hämolyse
1	4	schwach
2	6	„
3	8	mäßig
4	10	kompl.
5	20	„

Kontrollen:

1 bis 5 ohne Komplement: 0.

0,5 ccm 20fach sensibil. Widderspermatozoen in $^1/_5$ Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° + 0,5 ccm Hammelblut + 0,3 Kompl.: Spur.

0,5 ccm $^1/_5$ Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° + 0,5 ccm Hammelblut + 0,3 Kompl.: schwach.

Abguß von 1 ccm 10% Widderspermatozoen + 0,4 Amboc., dazu 1,0 ccm Hammelblut + 0,2 $^1/_{10}$ Amboc. + 0,1 Kompl.: kompl.

Versuch 13.

(8. XII. 1911.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Widderspermatozoen auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor Nr. 14 vom 26. XI. 1911. Lösende Dosis für Hammelblut: 0,008.

Widderspermatozoen vom 8. XII. 1911. 10%, 1 ccm.

Es werden folgende Röhrchen angesetzt:

Je 1 ccm Widderspermatozoen.

Gesamtvolumen 2,0 ccm.

	Mengen des Widder-spermatozoen-Kan.-Amboc.	Zahl der Einheiten
1.	0,4 $^1/_{10}$	5
2.	0,8 $^1/_{10}$	10
3.	0,96 $^1/_{10}$	12
4.	0,12	15
5.	0,16	20

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich 5 l. D.	10 l. D.	12 l. D.	15 l. D.	20 l. D.
0,4	0	—	—	—	—
0,2	—	0	0	fast 0	Spur
0,1	—	—	—	fast 0	Spürchen

Weitere Versuchsanordnung wie Versuch 12.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,4 ccm. Hämolyse
1	5	stark
2	10	f. kompl.
3	12	kompl.
4	15	"
5	20	"

Kontrollen:

1 bis 5 ohne Komplement: 0.

0,5 ccm 20fach sensibilisierte Widderspermatozoen in $^1/_5$ Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° + 0,5 ccm Hammelblut + 0,4 Kompl.: schwach.

0,5 ccm $^1/_5$ Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° + 0,5 ccm Hammelblut + 0,4 Kompl.: mäßig.

Abguß von 1 ccm 10% Widderspermatozoen + 0,16 Amboc., dazu 1,0 Hammelblut + 0,8 $^1/_{100}$ Amboc. + 0,1 Kompl.: kompl.

Versuch 14.

(23. II. 1912.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Widderspermatozoen auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor Ia vom 24. I. 1912. Lösende Dosis für Hammelblut 0,025.

Widderspermatozoen vom 21. II. 1912. 10%, 1 ccm.

Es werden folgende Röhrchen angesetzt:

Je 5 ccm Widderspermatozoen.

Gesamtvolumen 7,0 ccm.

Mengen des Widder-spermatozoen-Kan.-Amboc.	Zahl der Einheiten pro ccm Widderspermatozoen
1. 0,5	4
2. 0,75	6
3. 1,25	10
4. 1,9	15

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich 4 l. D. pro ccm Widderspermatozoen	6 l. D.	10 l. D.	15 l. D.
0,7	schwach	schwach	schwach	schwach
0,4	fast 0	"	"	"
0,14	—	—	Spur	Spur bis schwach
0,1	—	—	—	Spur

Zum Sediment, das 1 mal mit reichlich 0,85%iger Kochsalzlösung gewaschen wird, werden 5 ccm $^1/_5$ Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° und 5 ccm 5%iges Hammelblut hinzugesetzt. Die Röhrchen bleiben unter häufigem Schütteln 1 Stunde bei 40° im Wasserbade. Hierauf werden die Mischungen durch Filter Nr. 602 von Schleicher & Schüll (hart) im Eisschrank bei ca. 8° filtriert, worauf nach 3 Stunden das Filtrat aus einer stark verdünnten Erythrocytensuspension besteht, in der mikroskopisch keine Spermatozoen mehr nachzuweisen sind. Durch Zentrifugieren werden die Suspensionen dann so weit eingeengt, daß sie mit ihrem Färbeindex annähernd einer 5%igen Hammelblutaufschwemmung entsprechen. Zu je 0,5 ccm der so erhaltenen Erythrocytensuspensionen werden alsdann 0,05 ccm Komplement hinzugefügt. 2 Stunden bei 37° im Brutschrank.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,05 ccm zu 0,5 ccm Blut Hämolyse
1	4	stark bis fast kompl.
2	6	kompl.
3	10	„
4	15	„

Kontrollen:

0,5 ccm Hammelblut + 0,05 ccm Kompl.: Spürchen.

0,5 ccm Hammelblut (durch Filter Nr. 602 geschickt) + 0,05 ccm Kompl.: Spur.

Versuch 15.

(12. I. 1911.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Widderspermatozoen auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor vom 25. XI. 1911. Lösende Dosis für Hammelblut 0,005.

Widderspermatozoen vom 12. I. 1912. 10%, 1 ccm.

Es werden folgende Röhrchen angesetzt:

Je 3 ccm Widderspermatozoen.

Gesamtvolumen 4,0 ccm.

Mengen des Widder-spermatozoen-Kan.-Amboc.	Zahl der Einheiten pro ccm Widderspermatozoen
1. $0{,}6\,^1/_{10}$	4
2. $0{,}9\,^1/_{10}$	6
3. 0,12	8
4. 0,15	10
5. 0,18	12

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich 4 l. D. pro ccm Widderspermatozoen	6 l. D.	8 l. D.	10 l. D.	12 l. D.
0,5	0	0	0	—	—
0,3	—	0	0	0	0
0,2	—	—	0	0	0

Weitere Versuchsanordnung wie in Versuch 13. Zum Spermatozoensediment werden 3 ccm 5%igen Hammelblutes hinzugefügt. Filtration im Eisschrank durch Filter Nr. 602 12 Stunden. Erst dann Komplementzusatz.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,05 ccm zu 0,5 ccm Blut Hämolyse
1	4	Spur
2	6	"
3	8	schwach bis mäßig
4	10	stark
5	12	kompl.

Kontrollen:

0,5 ccm Hammelblut + 0,05 ccm Kompl.: Spur.

0,5 ccm Hammelblut (durch Filter Nr. 602 geschickt) + 0,05 ccm Kompl.: Spur.

In der folgenden Tabelle XVI, a und b, sind die Resultate der Versuche 12 bis 15 unter Hinzufügung von ergänzenden Bindungsversuchen zusammengefaßt und zum Vergleich die Ergebnisse entsprechender Experimente hinzugefügt, in denen es sich um den Übergang des Hammelblut-Kan.-Amboceptors von Widderspermatozoen auf Hammelblut handelt.

Als durchgreifender Unterschied zwischen beiden Amboceptoren tritt zunächst die beträchtlich stärkere Affinität der Widderspermatozoen-Amboceptoren zu den Widderspermatozoen gegenüber der weniger erheblichen Avidität der Hammelblutamboceptoren hervor. So werden in sämtlichen Versuchen bis zu 40 Einheiten der Spermatozoenamboceptoren von den Widderspermatozoen restlos gebunden, während bereits bei Darbietung von 5 lösenden Dosen die Hammelblutamboceptoren nur eine partielle Verankerung unter Freibleiben einer Amboceptoreinheit erfahren. Weiter werden von 15 Einheiten der Hammelblut-Kan.-Amboceptoren nur 10 bis 12, von 20 Einheiten nur 12 bis 14 beansprucht. Es sind somit die durch Spermatozoeninjektion erzeugten hämolytischen Immunsera gegenüber den durch Blutbehandlung erzeugten Amboceptoren durch ihre stärkere Avidität zu den Receptoren der sie auslösenden Samenzellen charakterisiert.

Wie Tabelle XVI nun weiter demonstriert, vollzieht sich der Amboceptorübergang von Widderspermatozoen auf Hammelblut bei Hammelblut-Kan.-Amboceptoren un-

gleich leichter als bei Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren.

Tabelle XVIa.

Übergang der Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren von Widderspermatozoen auf Hammelblut.

Widderspermat.-Kan.-Amboceptor vom	Amboceptoreinheit für Hammelblut	Widderspermatozoen									
		bei Darbietung von Widderspermatozoen-Kan.-Amboc.									
		binden von									geben 1 Einheit ab bei ursprüngl. Bindung von
		4 l. D.	5 l. D.	6 l. D.	8 l. D.	10 l. D.	12 l. D.	15 l. D.	20 l. D.	40 l. D.	
25. XI. 11	0,02	4	—	6	8	10	—	—	20	40	10 Einheiten
25. XI. 11	0,005	4	—	6	8	10	12	—	—	40	12 Einheiten
26. XI. 11	0,008	—	5	—	—	10	12	15	20	40	12 Einheiten
24. I. 12	0,025	4	—	6	—	10	—	15	—	40	6 Einheiten

Tabelle XVIb.

Übergang der Hammelbut-Kan.-Amboceptoren von Widderspermatozoen auf Hammelblut.

Hammel-Kan.-Amboceptor vom	Amboceptoreinheit für Hammelblut	Widderspermatozoen							
		bei Darbietung von Hammelblut-Kan.-Amboc.							
		binden von							geben 1 Einheit ab bei ursprünglicher Bindung von
		5 l. D.	6 l. D.	9 l. D.	10 l. D.	12 l. D.	15 l. D.	20 l. D.	
25. I. 11	0,0004	—	4	7	—	9	12	14	4 Einheiten
22. IV. 11	0,001	4	—	—	8	—	13	15	4 Einheiten
14. III. 11	0,0025	—	4	—	7	—	10	12	4 Einheiten

Während in ersterem Falle die ursprüngliche Bindung von vier Einheiten bereits den Übergang einer Einheit auf Hammelblut in sämtlichen Experimenten ermöglicht, findet bei Darbietung von Widderspermatozoenamboceptoren eine Abgabe einer Einheit auf Hammelblut erst bei ursprünglicher Bindung von 6, 10 und 12 Einheiten an die Widderspermatozoen statt.

Es treten somit im Übergangsphänomen Differenzen zwischen Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren und Hammelblut-Kan.-Amboceptoren in die Er-

scheinung nach der Richtung hin, daß der Amboceptorübergang von homologen Spermatozoen auf homologes Blut sich bei Blutamboceptoren ungleich leichter als bei Widderspermatozoenamboceptoren vollzieht.

Es weist dieser Befund darauf hin, daß zwischen den Immunhämolysinen, die ihre Entstehung der Injektion von gleichartigen Blutkörperchen oder Organzellen verdanken, bei allen gemeinschaftlichen Eigenschaften doch konstitutionelle Differenzen bestehen.

Daß Spermatozoen und Erythrocyten in ihren chemischen Verwandtschaftsbeziehungen zum homologen Spermatozoenamboceptor sich ungefähr gleich verhalten, daß also, entgegen der Ansicht Moxters, der hämolytische Immunkörper im Spermatozoen-Immunserum keine stärkere Affinität zu homologen Spermatozoen als zu homologen Erythrocyten aufweist, zeigt der folgende Versuch, aus dem hervorgeht, daß die Reaktionstendenz der Spermatozoen zur hämolytischen Komponente des spermotoxischen Immunserums nicht ohne weiteres ausreicht, um die Verbindung zwischen Spermatozoenamboceptor und homologen Erythrocytenreceptoren zu sprengen.

Versuch 17.

(29. XI. 1911.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Hammelblut auf Widderspermatozoen.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor vom 25. XI. 1911.
Lösende Dosis für Hammelblut 0,004.
Widderspermatozoen vom 28. XI. 1911, 10%, 1 ccm.
Es werden folgende Röhrchen angesetzt:
Je 1 ccm 5%iges Hammelblut
Gesamtvolumen 2,0 ccm.

Mengen des Widderspermat.-Kan.-Amb.	Zahl der Einheiten
1. $0{,}4\,^1/_{100}$	1
2. $0{,}8\,^1/_{100}$	2
3. $0{,}12\,^1/_{10}$	3
4. $0{,}24\,^1/_{10}$	4

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich 4 l. D.
2,0	Spur

Zum einmal mit 0,85%iger NaCl-Lösung gewaschenen Erythrocytensediment wird 1 ccm 1/5 Mensch.-Serum (1/8 Std. 65°) + 1 ccm 10%ige Widderspermatozoen hinzugefügt. Weitere Behandlung wie üblich.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Kompl.-Zusatz von 0,1 ccm zu 1,0 ccm Erythrocyten-Spermatozoenmischung. Hämolyse:
1	1	kompl.
2	2	„
3	3	„
4	4	„

1 bis 4 ohne Komplement: 0.

Kontrollen:

Spermatozoen +	Hammelblut +	Kompl.	Hämolyse
0,5 (in 1/5 Menschenserum)	0,5	0,1	Spur

Es tritt in sämtlichen Röhrchen komplette Hämolyse ein, ein Beweis dafür, daß der an die roten Blutkörperchen verankerte Spermatozoen-Amboceptor auf diese trotz der Anwesenheit der Spermatozoen zur Wirkung gelangt und nicht auf die homologen Spermatozoen überwandert. Es differiert somit die Avidität der homologen Spermatozoen zur hämolytischen Komponente des spermotoxischen Immunserums nicht wesentlich von der der homologen Erythrocyten-Receptoren.

Wir sind zum Schluß in einer weiteren Serie von Versuchen noch der Frage nähergetreten, inwieweit die beschriebenen Aviditätsbeziehungen zwischen Spermatozoen-Amboceptoren und homologen Spermatozoen streng artspezifisch, bzw. der Ausdruck organspezifischer Beziehungen sind. Soweit die spermotoxische Komponente der Spermatozoen-Immunsera in Betracht kommt, hat schon Moxter nachgewiesen, daß ein auf Hammelspermatozoen eingestelltes Immunserum bis zu einem gewissen Grade auch auf das Sperma des Stieres spermotoxisch zu wirken vermag. Ganz analoge Verhältnisse bestehen bei dem spezifischen Hämolysin der Spermatozoen-Immunsera, das von Rinderspermatozoen gleichfalls gebunden wird. Lassen sich somit in ähnlicher Weise wie bei den Erythrocyten auch im chemischen Bau von Spermatozoen

verschiedener Tierspezies Verwandtschaften nachweisen, so ergeben sich doch für die Beziehungen der Spermatozoen-Amboceptoren zu homologen und heterologen Spermatozoen bemerkenswerte Unterschiede, wie dies die folgenden Versuche demonstrieren:

Versuch 18.

(8. II. 12.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Rinderspermatozoen auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor vom 24. I. 12 (Ia). Lösende Dosis für Hammelblut 0,01.

Rinderspermatozoen vom 28. II. 12, 10%, 1 ccm.

Es werden folgende Röhrchen angesetzt:

Je 1 ccm 10%ige Rinderspermatozoen.

Gesamtvolumen 2,0 ccm.

Mengen des Widderspermat.-Kan.-Amboc.	Zahl der Einheiten
1. $0{,}1\,^1/_{10}$	1
2. $0{,}3\,^1/_{10}$	3
3. $0{,}5\,^1/_{10}$	5
4. $0{,}7\,^1/_{10}$	7

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich 1 l. D.	3 l. D.	5 l. D.	7 l. D.
2,0	mäßig	—	—	—
1,0	—	stark	f. kompl.	f. kompl.
0,7	—	stark-mäßig	—	stark
0,4	—	—	mäßig	—
0,3	—	—	—	stark-mäßig

Zum Sediment 1 ccm $^1/_5$ Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° + 1 ccm 5%iges Hammelblut.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:
1	1	f. kompl.
2	3	kompl.
3	5	„
4	7	„

1 bis 4 ohne Komplement: 0.

Rinderspermatozoen (in $^1/_5$ Menschenserum)	+ Hammelblut	+ Kompl.	Hämolyse
0,5	0,5	0,1	Spur

Versuch 19.

(8. II. 12.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Rinderspermatozoen auf Hammelblut.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor 13 vom 25. XI. 11. Lösende Dosis für Hammelblut 0,002.

Rinderspermatozoen vom 8. II. 12, 10%, 1 ccm.

Es werden folgende Röhrchen angesetzt:

Je 1 ccm 10%ige Rinderspermatozoen.

Gesamtvolumen 2,0 ccm.

Mengen des Widderspermat.-Kan.-Amboc.	Zahl der Einheiten
1. $0{,}2^1/_{100}$	1
2. $0{,}6^1/_{100}$	3
3. $1{,}0^1/_{100}$	5
4. $0{,}14^1/_{10}$	7

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich 1 l. D.	3 l. D.	5 l. D.	7 l. D.
2,0	mäßig-schwach	—	—	—
1,0	—	mäßig-stark	f. kompl.	kompl.
0,7	—	—	—	f. kompl.
0,4	—	—	mäßig-stark	—
0,3	—	—	—	stark-mäßig

Zum Sediment 1 ccm $^1/_5$ Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° + 1 ccm 5%iges Hammelblut.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse
1	1	f. g. kompl.
2	3	kompl.
3	5	„
4	7	„

1 bis 4 ohne Komplement: 0.

Rinderspermatozoen (in $^1/_5$ Menschenserum)	+ Hammelblut	+ Kompl.	Hämolyse
0,5	0,5	0,1	Spur

Es ist somit die Avidität zwischen Spermatozoen-Immunserum und heterologem Sperma ebenso wie die Stabilität ihrer Verbindung eine ungleich viel geringere als die homologer Komponenten. Während homologe Spermatozoen bis zu 40 Einheiten, wie wir gezeigt haben, von homologen Spermatozoen-Amboceptoren restlos binden und erst bei einer Minimalquantität von 6 ursprünglich ge-

bundenen Einheiten eine Einheit auf Hammelblut übergehen lassen, vermögen Rinderspermatozoen von Widderspermatozoen-Amboceptoren selbst eine Einheit nicht vollständig zu binden und geben die verankerten Einheiten außerordentlich leicht auf Hammelblut ab.

Besteht somit zwischen Spermatozoen und Spermatozoen-Amboceptoren eine ausgesprochene Artspezifität, so zeigen die folgenden Experimente auch die markante Organspezifität der hämolytischen Komponente spermotoxischer Immunsera.

Versuch 20.

(25. I. 12.)

Übergang des Widderspermatozoen-Amboceptors von Hammelleber auf Hammelblut.

Hammelleberzellen vom 24. I. 12, 10%, 1 ccm.

Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptor 13 vom 25. XI. 11. Lösende Dosis für Hammelblut 0,004.

Es werden folgende Röhrchen angesetzt:

Je 1 ccm Hammelleberzellen.

Gesamtvolumen 2,0 ccm.

Mengen des Widderspermat.-Kan.-Amboc.	Zahl der Einheiten
1. $0{,}4\,^1/_{100}$	1
2. $0{,}12\,^1/_{10}$	3
3. $0{,}2\,^1/_{10}$	5
4. $0{,}28\,^1/_{10}$	7

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich 1 1. D.	3 1. D.	5 1. D.	7 1. D.
2,0	f. 0	—	—	—
0,7	—	schwach	mäßig	mäßig-stark
0,4	—	—	schwach	mäßig
0,3	—	—	—	—

Zum Sediment 1 ccm $^1/_5$ Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° + 1 ccm 5%iges Hammelblut.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse:
1	1	kompl.
2	3	„
3	5	„
4	7	„

1 bis 4 ohne Kompl.: 0.

Leberzellen in $^1/_5$ Mensch.-Serum	Hammelblut	Kompl.	Hämolyse
0,5	0,5	0,1	f. 0

Versuch 21.

(26. I. 12.)

Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von Hammelleber auf Hammelblut.

Hammelleberzellen vom 24. I. 1912, 10%, 1 ccm.

Widderspermat.-Kan.-Amboceptor Ia vom 24. I. 1912. Lösende Dosis für Hammelblut 0,05.

Es werden folgende Röhrchen angesetzt:

Je 1 ccm Hammel-Leberzellen.

Gesamtvolumen 2,0 ccm.

Mengen des Widderspermat.-Kan.-Amboc.	Zahl der Einheiten
1. 0,5 1/10	1
2. 0,15	3
3. 0,25	5
4. 0,35	7

Untersuchung des Abgusses.

Abgußmengen ccm	Hämolyse bei Darbietung von ursprünglich 1 l. D.	3 l. D.	5 l. D.	7 l. D.
2,0	schwach	—	—	—
0,7	—	mäßig	kompl.	kompl.
0,4	—	—	mäßig	„
0,3	—	—	—	mäßig

Zum Sediment 1 ccm 1/5 Menschenserum + 1 ccm 5%igesHammelblut.

Übergangsversuch.

Röhrchen	Einheiten	Komplementzusatz von 0,1 ccm Hämolyse
1	1	kompl.
2	3	„
3	5	„
4	7	„

1 bis 4 ohne Kompl.: 0.

Leberzellen in 1/5 Mensch.-Serum	Hammelblut	Kompl.	Hämolyse
0,5	0,5	0,1	Spur

Es besitzen also die Leberzellen der gleichen Tierspezies nur eine sehr geringe Avidität zum homologen Spermatozoenamboceptor, die sowohl in dem geringen Bindungsvermögen, wie in der leichten Reversibilität der Spermatozoenamboceptor-Leberzellenverbindung zum Ausdruck kommt.

Wir gelangen somit zu folgendem Fazit:

I. Die hämolytische Komponente spermotoxischer Immunsera, die durch Behandlung von Kaninchen mit Widderspermatozoen erzeugt sind, ist mit den in der üblichen Weise durch Hammelblutinjektionen bei Kaninchen gewonnenen hämolyti-

schen Amboceptoren nicht identisch. Die Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren lassen sich gegenüber den Hammelblut-Kan.-Amboceptoren durch folgende Charakteristica abgrenzen:

1. Durch die Existenz einer beträchtlich stärkeren Avidität der Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptoren zu ihren homologen Spermatozoen, die sich gegenüber den Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Hammelblut-Kan.-Ambocptoren und Widderspermatozoen demonstriert:

α) in einem sehr erheblichen Bindungsvermögen der Spermatozoenamboceptoren für homologe Spermazellen,

β) in einer geringeren Reversibilität der Verbindung zwischen Widderspermatozoen und Widderspermatozoenamboceptor.

2. Durch das Fehlen globulizider Eigenschaften für Rinderblutkörperchen.

II. Die Avidität der Zellen zum Hammelblut-Kan.-Amboceptor nimmt von den homologen Erythrocyten zu den homologen Spermatozoen an Intensität ab, während die Avidität der Spermatozoenamboceptoren zu denselben Zellelementen in gleicher Weise ausgesprochen erscheint.

III. Der Übergang des Widderspermatozoen-Kan.-Amboceptors von homologem und heterologem Blut auf homologes Blut unterliegt im übrigen den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie der des Hammelblut-Kan.-Amboceptors.

IV. Die Beziehungen zwischen Spermazellen und Spermatozoenamboceptor sind markant art- und organspezifische.

V. Rinderspermatozoen und Hammelleberzellen binden im Gegensatz zu Widderspermatozoen nur wenig von Widderspermatozoenamboceptoren und geben diese auch außerordentlich leicht auf Hammelblut ab.

VI. Auch für den Übergang der Spermatozoenamboceptoren ist das Verhältnis der Aviditäten von abgebenden zu empfangenden Zellelementen von maßgebender Bedeutung (Prinzip der konkurrierenden Aviditäten).

VII. Entsprechend der pluralistischen Anschauung Ehrlichs und Morgenroths, wonach die auf Hammelblut und Rinderblut wirkenden hämolytischen Amboceptoren des Hammelblut-Kan.-Immunserums auf zwei differente Fraktionen von Immunkörpern im Serum zurückzuführen sind, ergeben sich auch im Übergangsphänomen charakteristische Modalitäten, je nachdem der Übergang der auf Hammelblut oder Rinderblut wirkenden Fraktion sich von Rinderblut auf Hammelblut vollzieht.

Zur Frage nach dem Alkoholverbrauch bei der Pflanzenatmung.

Von

W. Zaleski und A. Reinhard.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Charkow.)

(Eingegangen am 6. Mai 1912.)

Vor kurzem haben wir die Vermutung ausgesprochen[1]), daß die CO_2-Produktion der zerriebenen Erbsensamen nicht nur im Wasserstoff, sondern auch in der Luft, wenn Toluol im Überschuß vorhanden ist, durch alkoholische Gärung bedingt wird. Dennoch haben wir weniger Alkohol gefunden, als man nach der Menge der ausgeschiedenen CO_2, bzw. nach der Gleichung der alkoholischen Gärung erwarten sollte. Es schien uns wenig wahrscheinlich, daß in diesem Falle ein Teil der vom Mehl ausgeschiedenen Kohlensäure nicht der alkoholischen Gärung entstammt, sondern eines anderen Ursprungs ist. Man kann eher vermuten, daß die Bestimmung des Alkohols in unseren Versuchen mit einem Verluste desselben verbunden war. So z. B. kann der Verlust an Alkohol durch die Verflüchtigung desselben infolge der großen Oberfläche zerriebener Samen, die in dünner Schicht in den Rezipienten verteilt wurden, bedingt sein. Es ist aber wohl möglich, daß in diesem Falle auch eine Oxydation oder eine Umwandlung des Alkohols stattfindet.

Zur Lösung dieser Frage haben wir zuerst die Versuche mit fein pulverisierter Knochenkohle ausgeführt, die mit Alkohol befeuchtet und in derselben Weise wie die zerriebenen Samen in Rezipienten verteilt wurde. In diesem Falle kann man den Alkohol ohne Verlust bestimmen und die Verflüchtigung desselben leichter konstatieren, wenn eine solche überhaupt in den Be-

[1]) Zaleski und Reinhard, diese Zeitschr. **35**, 238, 1911.

dingungen unserer Versuche stattfindet. Weiter haben wir es in diesem Falle nur mit der Abnahme des Alkohols zu tun, während in den zerriebenen Samen zwei entgegengesetzte Prozesse, wie die Bildung und der Verlust desselben, stattfinden können. Wenn die Kohle Alkohol oxydieren kann, indem sie wie eine Oxydase wirkt, so können das auch zerriebene Samen ausführen.

In diesen Versuchen wurden die Portionen des Knochenkohlepulvers zu je 25 g in Kolben mit 2%iger Alkohollösung und Toluol (2 bis 4%) vermengt, und das Gemisch wurde in diesen in dünner Schicht auf den Wänden verteilt. In den besonderen Proben der Lösung, die zu den Versuchen dienten, wurde der Alkohol pyknometrisch bei 15,5° bestimmt. Die Quantität des Alkohols schwankte zwischen 480 bis 506 mg, da die Lösung nicht immer genau bereitet wurde. Durch den Kolben wurde Luft oder Wasserstoff durchgeleitet, und vor dem Rezipienten, wie in den Versuchen mit Samen, wurde eine Toluol enthaltende Flasche eingeschaltet. Hinter dem Kolben wurden ein Absorptionsgefäß und zwei Drechselflaschen mit Wasser eingeschaltet, die während des Versuchs, der meistens 24 Stunden dauerte, in schmelzendes Eis gestellt waren. Vorläufige Versuche haben uns gezeigt, daß in die dritte Flasche kein Alkohol übergeht.

In anderen Versuchen wurde der Kolben nach dem Befeuchten der Kohle mit Alkohollösung luftdicht verschlossen und nach beendigtem Versuche zur Alkoholbestimmung benutzt, die mit größter Vorsicht ausgeführt wurde. Das übergangene Toluol wurde vom Destillat in einem Scheidetrichter abgeschieden.

Versuche 1 bis 5.

Fein pulverisierte Knochenkohle wurde mit 2%iger Alkohollösung und Toluol befeuchtet und zu den Versuchen benutzt. Toluolstrom.

Alkohol in mg.

Alkohollösung	482	490	490	506	506
Kohle im Wasserstoff	430	455	—	—	—
Geschlossener Kolben	—	390	410	—	—
Kohle in der Luft	—	—	—	380	365

Temp. = 15 bis 17°.

In allen Versuchen beobachten wir eine Abnahme des Alkohols, die nicht durch die Verflüchtigung desselben erklärt sein kann, da wir im geschlossenen Kolben eine kleinere Alkohol-

menge als im Wasserstoff finden. Da die Kohle die größte Menge des Alkohols in dem Luftstrome und dann in dem geschlossenen Kolben und die geringste Quantität im Wasserstoff verliert, so ist es klar, daß das Verschwinden des Alkohols als ein Oxydationsprozeß betrachtet werden muß. Die Oxydation des Alkohols durch die Kohle im Wasserstoff hängt von dem Vorrat des aktivierten Sauerstoffs ab.

Dieselbe Erscheinung haben wir auch bei der Oxydation der Oxalsäure durch die Kohle beobachtet[1]). So findet die Oxydation der Oxalsäure durch die Kohle auch im Wasserstoff, aber nur am Anfange des Versuches, statt und hört bald auf.

Die Oxydation der Oxalsäure haben wir auch beim Befeuchten zerriebener Weizensamen mit der Lösung dieser Säure beobachtet, aber nur in dem Falle, wenn das Samenpulver nicht vor dem Versuche mit Methylalkohol oder vermittels hoher Temperatur abgetötet worden war. Demgegenüber oxydierten weder die zerriebenen Erbsensamen, noch das Weizenkeimpulver die benutzte Oxalsäurelösung.

Aus Analogie kann man erwarten, daß zerriebene Samen auch Alkohol und dabei mit verschiedener Intensität oxydieren werden.

Die Versuche mit zermahlenen Objekten wurden in derselben Weise wie die oben erwähnten mit Kohle ausgeführt. Der Alkohol wurde zuerst bei saurer und dann bei alkalischer Reaktion abdestilliert und das übergangene Toluol wurde im Destillat in einem Scheidetrichter abgeschieden. Auf Grund vieler Bestimmungen glauben wir, daß 25 mg des Alkohols innerhalb der Fehlergrenzen der Versuche liegen.

Versuche 5 bis 10.

25 g zerriebener Erbsensamen wurden mit 25 ccm der 2%igen Alkohollösung und Toluol befeuchtet und zu den Versuchen benutzt. Toluolstrom.

Alkohol in mg.

Kontrollportion[2]) . .	482	482	470	470
Wasserstoffstrom . .	470	460	—	—
Luftstrom	—	440	420	430

Temp. = 16 bis 17°.

[1]) Zaleski und Reinhard, diese Zeitschr. **33**, 450, 1911.

[2]) Unter der Kontrollportion verstehen wir die Alkohollösung, mit der die zerriebenen Objekte befeuchtet wurden.

Versuche 11 und 12.

25 g zerriebener Weizensamen wurde mit 25 ccm der 2%igen Alkohollösung und Toluol befeuchtet und zu den Versuchen benutzt. Toluolstrom.

	Alkohol in mg.	
Kontrollportion	482	488
Luftstrom	380	395

Temp. = 16 bis 17°.

Versuche 13 und 14.

12 g pulverisierter Stengelspitzen der etiolierten Keimpflanzen von Vicia Faba Windsor, die bei 35° im Thermostaten getrocknet worden waren, wurden mit 17 bis 25 ccm der 2%igen Alkohollösung und Toluol befeuchtet und zu den Versuchen benutzt. Toluolstrom.

	Alkohol in mg.	
Kontrollportion	325	482
Luftstrom	170	365

Temp. = 16°.

Im Wasserstoffstrome verlieren die zermahlenen Erbsensamen eine ganz kleine Quantität des Alkohols, die innerhalb der Fehlergrenzen der Analyse liegt, während in dem Luftstrome die Abnahme des Alkohols sehr bedeutend ist. Da aber die Objekte gleichzeitig Alkohol bilden, so ist es wahrscheinlich, daß die Abnahme des letzteren in Wirklichkeit eine größere ist. Diese Vermutung ist desto wahrscheinlicher, weil die 2%ige Alkohollösung fast keine Wirkung auf die Kohlensäureausscheidung dieser Objekte ausübt[1]).

Infolge des Verbrauchs des Alkohols finden wir[2]), daß das Verhältnis $CO_2 : C_2H_5OH$ in den zerriebenen Erbsensamen der Gleichung der alkoholischen Gärung nicht entspricht. Auch hat Iwanoff[3]) dieses Verhältnis gleich 100 : 67,8 und 100 : 80 gefunden. Wenn aber Iwanoff das Verhältnis $CO_2 : C_2H_5OH$ gleich 100 : 91,5 und sogar 100 : 96,8 in den mit Zyminextrakt befeuchteten zerriebenen Erbsensamen beobachtet, so kann dies von einer äußerst schwachen Aeration in seinen Versuchen oder von anderen Ursachen abhängen.

---

[1]) Wie aus den in unserem Laboratorium ausgeführten Versuchen zu ersehen ist.

[2]) Zaleski und Reinhard, diese Zeitschr. **35**, 238, 1911.

[3]) Iwanoff, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **29**, 564, 1911.

Eine bedeutende Abnahme des Alkohols finden wir in zerriebenen Weizensamen und eine noch größere in den Versuchen mit pulverisierten Spitzen von Vicia Faba.

Es ist keine Notwendigkeit, das Vorhandensein eines besonderen Ferments für Alkoholoxydation anzunehmen, und wir stimmen Engler und Herzog bei, daß die Bedeutung der Fermente in den Oxydationsprozessen überschätzt wird.

Es liegen auch keine Gründe vor, um die Existenz einer Oxydase in der Kohle anzunehmen, obwohl einige durch diese bewirkten Oxydationen solchen der Organismen sehr ähnlich sind.

Kostytschew[1]) hat nachgewiesen, daß die Peroxydase der Weizenkeime nach Hydroperoxydzusatz die durch Zymin vergorenen Zuckerlösungen unter CO_2-Bildung oxydiert. Der Verfasser vermutet, daß in seinen Versuchen eine Oxydation der Zwischenprodukte der Zuckergärung stattfand. Wir haben dasselbe Resultat bekommen, indem wir statt Peroxydase Knochenkohlepulver in dieses System eingeführt haben. Wenn wirklich in den Versuchen von Kostytschew eine Oxydation der Zwischenprodukte der Alkoholgärung stattfand, so ist es sehr wahrscheinlich, daß in unseren Versuchen die Knochenkohle dieselbe Rolle spielt.

Es bleibt aber unentschieden, ob in den Versuchen von Kostytschew wirklich die Oxydation der Zwischenprodukte der Alkoholgärung stattfand, und über diese Frage gedenken wir später zu berichten.

[1]) Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 116, 1910.

Über den Einfluß des Adrenalins auf den respiratorischen Quotienten und die Wirkungsweise des Adrenalins.

Von

G. G. Wilenko.

(Aus dem physiologischen Institut der k. k. Hochschule für Bodenkultur in Wien.)

(Eingegangen am 6. Mai 1912.)

Über das Verhalten des respiratorischen Quotienten unter dem Einflusse des Adrenalins liegen bisher Untersuchungen von La Franka[1]) beim Hunde, von Fuchs und Roth[2]) beim Menschen und von Harri[3]) beim Hunde vor. La Franka fand keine Veränderungen, desgleichen Fuchs und Roth beim gesunden Menschen. Harri hat eine Steigerung des RQ feststellen können, diese beträgt aber im Mittel nur ca. 4,7 %, wenn man nämlich nur die Versuche mit subcutaner Adrenalineinspritzung in Betracht zieht; die Versuche Harris mit intravenöser Adrenalinapplikation zeigen zwar eine größere Veränderung des RQ, sie tritt aber gleich nach Einführung des Adrenalins ein, also zu einer Zeit, wo die Wirkung des Adrenalins auf den Stoffwechsel sich noch nicht geltend machen kann. Zusammenfassend kann man also sagen, daß das Adrenalin den respiratorischen Quotienten entweder unbeeinflußt läßt, oder eine kleine Steigerung hervorruft.

Bei der Diskussion dieser Ergebnisse muß in Betracht gezogen werden, daß sowohl unter Adrenalinwirkung, wie auch bei allen anderen Hyperglykämie hervorrufenden Eingriffen, zwei Momente für die Beeinflussung des respiratorischen Quo-

---

[1]) La Franka, Zeitschr, f. experm. Pathol. u. Ther. **6**.

[2]) Fuchs und Roth, Zeitschr. f. experm. Pathol. u. Ther. **10**.

[3]) Harri, diese Zeitschr. **38**.

tienten zu berücksichtigen sind. Erstens der angewendete Eingriff und weiter auch die Hyperglykämie für sich, ohne Rücksicht auf die Art ihrer Entstehung.

Es ist nämlich aus den Versuchen von Zuntz[1]) und Volpers[2]) bekannt, daß Glucose, direkt in die Blutbahn eingeführt, den RQ gewaltig in die Höhe treibt; weiter wissen wir, daß, wie Magnus-Levy[3]), Johanson[4]), Durig[5]) u. a. bewiesen haben, die Verabreichung von größeren Kohlenhydratmengen per os ebenso den RQ bedeutend steigert. Die von mir ausgeführten Versuche mit subcutaner Einführung von Glucose zeigen dieselbe Erscheinung (s. Vers. 7 und 9 in Tab. I). Andererseits ist aber nachgewiesen, daß nach Verabreichung von größeren Kohlenhydratmengen, sowohl per os wie auch subcutan, eine Hyperglykämie zustande kommt [Frank[6]), Baudain[7]), Wilenko[8]) und Tab. III]. Es liegen also folgende Tatsachen vor: bei jeder Zuführung von größeren Kohlenhydratmengen (per os oder parenteral) steigt im allgemeinen der respiratorische Quotient; bei jeder Zuführung von größeren Kohlenhydratmengen kommt, wenn nicht besondere Bedingungen vorwalten, eine Hyperglykämie zustande; intravenöse Zuführung von Glucose steigt den RQ. Es ist aus diesen Tatsachen kaum ein anderer Schluß zu ziehen, als daß die Hyperglykämie für sich, beim normalen Tier, eine Steigerung des respiratorischen Quotienten hervorruft[9]).

Vandeput[10]) hat dann weiter gezeigt, daß mit zunehmender Blutzuckerkonzentration auch in vitro die glykolytische Kraft des Blutes zunimmt. Wir wollen gleich bemerken, daß

[1]) Zuntz und Mering, Arch. f. d. ges. Physiol. 32.

[2]) Volpers, Arch. f. d. ges. Physiol. 32.

[3]) Magnus-Levy, Arch. f. d. ges. Physiol. 55.

[4]) Johanson, Skandin. Arch. 21.

[5]) Durig, Sitzungsber. d. Wien. Akad. 86, Math.-naturwissensch. Kl.

[6]) Frank, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70.

[7]) Baudain, Thése de Paris 1908.

[8]) Wilenko, Tygodnik lekarski 1911.

[9]) Im hiesigen Laboratorium wurde die Beobachtung gemacht, daß beim Menschen unter gewissen Bedingungen die Darreichung von Glucose keine Steigerung des RQ zur Folge hat, in diesem Falle ist auch der Blutzuckergehalt normal gefunden worden. Brezina und Tögl werden in Bälde darüber berichten.

[10]) Vandeput, Arch. internat. de Physiol. 9.

wir bei den vorstehenden wie auch den folgenden Betrachtungen die Frage des Verhaltens des Gesamtstoff- und Energiewechsels ganz beiseite lassen, da der Einfluß der Hyperglykämie auf den RQ von diesen Prozessen unabhängig ist.

Es ist auch gleichgültig für die uns interessierende Frage, ob die gesteigerte Glykolyse, die im hohen RQ ihren Ausdruck findet, dadurch zustande kommt, daß — was wahrscheinlich ist — dieselben glykolytischen Kräfte infolge größeren Angebotes von Zersetzungsmaterial intensiver sich betätigen können, oder auch — daß die höhere Blutzuckerkonzentration Reservekräfte zur Funktion anregt.

Nach den erörterten Erfahrungen der Physiologie wäre bei der Adrenalinwirkung, schon wegen der bedeutenden Hyperglykämie, eine bedeutende Steigerung des RQ zu erwarten; eine viel höhere sogar, als nach Zufuhr von Kohlenhydraten, da die Adrenalinhyperglykämie bei weitem stärker ist, als die alimentäre Hyperglykämie. Nun ergibt aber das Experiment ganz andere Resultate. Sowohl die Versuche der eingangs erwähnten Autoren, wie auch meine eigenen an Uretankaninchen angestellten (s. Vers. 16 und 17 in Tab. I) ergeben einen RQ, der gar nicht oder sehr wenig von der Norm abweicht. Der Harnbefund bei meinen Versuchen zeigt, daß die Tiere auf das Adrenalin mit Glucosurie reagiert haben. Wir müssen daraus schließen, daß die Adrenalinhyperglykämie keine oder jedenfalls keine beträchtlichere über die Norm gesteigerte Kohlenhydratverbrennung nach sich zieht, und es ergibt sich daraus ein wichtiger Unterschied zwischen dieser und der alimentären Hyperglykämie.

Zwei Möglichkeiten könnten diesen Unterschied erklären. Es kann der Blutzucker nach Adrenalininjektion sich in solcher Form im Blut befinden, daß er durch die glykolytischen Kräfte nicht angegriffen werden kann; oder aber — die glykolytischen Kräfte werden durch das Adrenalin gehemmt oder gestört. (Es könnte eventuell der Mechanismus, demzufolge die Hyperglykämie eine stärkere Kohlenhydratverbrennung hervorruft, gestört sein.) Der Frage versuchten wir experimentell in der Weise näher zu treten, daß wir die Wirkung des Adrenalins auf die durch Zufuhr von Kohlenhydraten zustande kommende Steigerung des RQ einer Prüfung unterzogen. Unter diesen

Versuchsbedingungen war zu erwarten, daß sich die von Harri gefundene kleine Steigerung des RQ zu der alimentären Steigerung des RQ hinzuaddieren wird, und daß der RQ jetzt erst recht hoch ausfallen wird. Weiter war die Sicherheit gegeben, daß ein Teil des überschüssigen Blutzuckers, als von der Kohlenhydratzufuhr stammend, sich in einer für die Glykolyse zugänglichen Form befinden muß, und also unabhängig von jenem Blutzucker, der durch die Andrenalinwirkung hervorgerufen wurde — eine Steigerung des RQ zu bewirken fähig ist. Wenn aber auch in dieser Versuchsanordnung die Wirkung der Hyperglykämie auf den RQ ausbleiben oder nur unbedeutend sein sollte, so wäre es ein Beweis, daß die fehlende Steigerung des RQ bei der Adrenalinhyperglykämie nicht von der Form des Blutzuckers abhängig ist, sondern als Folge der Adrenalinwirkung auf die glykolytischen Kräfte des Organismus aufgefaßt werden muß.

Zu diesem Zwecke wurden nachstehende Versuche an Kaninchen ausgeführt.

Nachdem wir uns überzeugt hatten, daß auch bei diesen Tieren die Zuführung von größeren Kohlenhydratmengen eine bedeutende Steigerung des RQ hervorruft (s. Versuche 3, 4, 7, 9, Tab. I) haben wir dann in einer anderen Serie gleichzeitig Kohlenhydrate eingeführt und Adrenalin subcutan eingespritzt.

Für unsere Versuche war es ein günstiger Umstand, daß die Steigerung des respiratorischen Quotienten nach Kohlenhydratzuführung und die stärkste Adrenalinwirkung zeitlich zusammenfallen, d. h. in der zweiten und dritten Stunde nach dem Eingriffe maximale sind.

Die Versuche wurden am Zuntz-Geppertschen Apparat unter Verwendung einer Trockengasuhr ausgeführt, derer Gang durch Zug so erleichtert wurde, daß die Kaninchen gegen minimalen Widerstand atmeten. Angesichts des kleinen Atemvolums der Tiere wurden zur Vermeidung eines größeren schädlichen Raumes kleine Glasventile verwendet, die mit einem aus Fischblase hergestellten und mit einer Lösung von Celluloid in Aceton gekitteten Überzuge versehen waren.

Die Tiere wurden mittels Uretan per os in Halbnarkose versetzt und verhielten sich während des Versuches ruhig.

Zwar wurde im Verlaufe der Versuche der Eindruck gewonnen, daß das Uretan kein ganz indifferentes Agens für den Kohlenhydratstoffwechsel ist (s. a. Underhill)[1]), doch resultiert daraus keine Beeinträchtigung der Resultate, da stets unter gleichen Versuchsbedingungen gearbeitet wurde; die Versuche sind deshalb untereinander unbedingt vergleichbar.

Die Tracheotomie wurde $^1/_2$ Stunde nach der Uretangabe ausgeführt und ca. $^1/_2$ Stunde darauf mit dem Versuch begonnen. Während des Versuches wurden die Tiere warm zugedeckt. Am Tage des Versuches waren die Tiere nüchtern. Verwandt wurde Adrenalin Parke-Davis.

Aus den angeführten Tabellen sehen wir nun, daß, wie schon erwähnt, sowohl subcutane, wie ovale Zufuhr größerer Kohlenhydratmengen eine gewaltige Steigerung des respiratorischen Quotienten hervorruft. Im Mittel beträgt diese Steigerung 21% des Nüchternwertes und schwankt zwischen 16 und 31%. Die Steigerung ist schon in ca. einer Stunde nach Verabreichung der Kohlenhydrate sehr deutlich und geht in der zweiten Stunde noch weiter in die Höhe. Meine Versuche ergeben also am Kaninchen dasselbe Resultat, das die anfangs erwähnten Autoren am Menschen und am Hunde feststellen konnten.

Der respiratorische Quotient im Versuche 16 und 17a, bei dem die Tiere nur unter dem Einflusse des Adrenalins stehen, beträgt 0,783 und 0,781, ist also kaum von der Norm abweichend — was mit den Befunden von La Franka[2]) am Hunde, und Fuchs und Roth[3]) am gesunden Menschen in Einklang steht. Wenn wir jetzt die Versuche mit gleichzeitiger Zufuhr von Zucker und Adrenalin betrachten, so ergibt sich, daß in vier von fünf Versuchen von einer Steigerung des RQ überhaupt nicht gesprochen werden kann. Der RQ hält sich sowohl in der ersten, wie in der zweiten Stunde nach Adrenalinglucosezufuhr auf derselben Höhe mit kleinen Schwankungen in plus oder minus, wie man dies überhaupt bei respiratorischen Versuchen beobachtet. Nur im Versuche 12 sehen wir eine

---

[1]) Underhill, Journ. of Biolog. Chem. 9, Nr. 13.
[2]) La Franka, l. c.
[3]) Fuchs und Roth, l. c.

Steigerung des RQ um 8,8%. Es ist zu diesem Versuche zu bemerken, daß der Nüchtern-RQ bei diesem Tiere sehr niedrig war (Einfluß des Uretans?) und daß dieser Versuch eigentlich nur mit Versuch 9 verglichen werden kann, in dem ein ähnlich niedriger Nüchtern-RQ nach Zufuhr von Glucose ohne Adrenalin um 31% gestiegen war.

Doch wenn wir auch diesen Versuch bei der Berechnung des Mittelwertes mitzählen, erhalten wir eine Steigerung des RQ bei Adrenalinglucosetieren um 2,5% des Nüchternwertes, bei den reinen Glucosetieren beträgt diese Steigerung 21%.

Das Adrenalin hat also trotz der sehr günstigen Bedingungen für seine hyperglykämische Wirkung nicht nur gar keine Steigerung des respiratorischen Quotienten hervorgerufen, sondern es ist auch die physiologische Steigerung des RQ, die nach Zufuhr von Kohlenhydraten normaliter auftritt, durch das Adrenalin fast gänzlich unterdrückt worden.

Von den zwei erwogenen Möglichkeiten zur Erklärung des Ausbleibens der RQ-Steigerung bei der Adrenalinhyperklykämie entscheiden unsere Versuche zugunsten der zweiten; d. h. nicht eine besondere Form des Blutzuckers bei der Adrenalinhyperglykämie verhindert das Zustandekommen einer stärkeren Glykolyse, sondern die Ursache dieser Erscheinung muß auf der Einwirkung des Adrenalins auf die glykolytischen Prozesse beruhen, weil das Adrenalin auch die alimentäre RQ-Steigerung verhindert, bei dem doch der Blutzucker in einer der Glykolyse zugänglichen Form vorhanden ist.

Somit ergibt sich aus dem Studium des RQ eine neue Eigenschaft des Adrenalins, die Herabsetzung der glykolytischen Prozesse. In diesem Sinne sprechen auch die Versuche von Vandeput[1]), der im Blute der Adrenalintiere eine Verminderung der glykolytischen Kraft in vitro feststellen konnte.

Es entsteht nun die Frage, welche Rolle dieser Eigenschaft des Adrenalins im Gesamtbilde seiner Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel zuzuschreiben sei. Zur Erklärung vieler von den bis nun bekannten Erscheinungen der Adrenalinwirkung

[1]) Vandeput, l. c.

Ta-

Nr. Gewicht des Tieres Datum	Dauer	Atemvolum pro 1' Temp. Bar.	CO_2-Produkt. pro 1'	O_2-Verbrauch pro 1'	RQ	Bemerkungen	Dauer	Atemvolum pro 1' Temp. Bar.	CO_2-Produkt. pro 1'
	Nüchtern								Glucose
3. 2600 g 26. III.	16'	593,6 ccm 20,3° 750,4	2,95% 15,72 ccm	3,75% 19,97 ccm	0,786	2,6 g Uretan	18'	547,1 ccm 20,04° 750,4	3,73% 18,33 ccm
4. 1850 g 27. III.	28'	346,4 ccm 19,07° 751,1	3,0% 9,39 ccm	3,56% 11,15 ccm	0,843	1,8 g Uretan	16'	629,3 ccm 19,6° 751,1	3,07% 17,41 ccm
	Nüchtern								Glucose
7. 1650 g 1. IV.	17'	479,5 ccm 19,5° 724,5	3,51% 14,69 ccm	4,28% 17,83 ccm	0,820	1,6 g Uretan			
9. 2850 g 5. IV.	26'	373,6 ccm 20,1° 745,4	4,3% 14,33 ccm	6,4% 21,33 ccm	0,672	2,8 g Uretan	23'	464,9 ccm 20.25° 745,4	3,86% 16,83 ccm
	Nüchtern								Glucose per os,
5. 1800 g 28. III.	21'	480,5 ccm 19° 745,5	2,58% 11,12 ccm	2,92% 12,59 ccm	0,884	1,8 g Uretan	24'	387,5 ccm 19,6° 745,5	3,01% 10,43 ccm
10. 2500 g 6. IV.	verunglückt					2,5 g Uretan	17'	625,8 ccm 21,2° 741,4	3,68% 23,03 ccm
11. 2250 g 10. IV.	15'	701,7 ccm 19,65° 733,4	3,71% 22,90 ccm	4,38% 27,03 ccm	0,847	2,3 g Uretan			
12. 3000 g 11. IV.	18'	611,5 ccm 20,16° 737,4	2,99% 16,13 ccm	4,29% 23,14 ccm	0,697	3 g Uretan			
	Nüchtern								
13. 1550 g 13. IV.	29'	353,6 ccm 20,06° 751,4	3,46% 10,76 ccm	4,32% 13,75 ccm	0,801	1,6 g Uretan			

belle I.

O_2-Verbrauch pro 1'	RQ	Bemerkungen	Dauer	Atemvolum pro 1' Temp. Bar.	CO_2-Produkt. pro 1'	O_2-Verbrauch pro 1'	RQ	Bemerkungen
per os				Glucose per os				
4,09 % 20,09 ccm	0,912	50' n. Einführg. v. 23 g Zucker in 70 ccm H_2O	16'	573,1 ccm 19,8° 750,4	4,0 % 20,62 ccm	4,08 % 21,03 ccm	0,980	2h 7' nach der Zuckereinführung. Urin: Zucker +
3,42 % 19,62 ccm	0,897	68' n. Einführg. v. 20 g Zucker in 60 ccm Wasser	20'	518,1 ccm 19,9° 751,1	3,56 % 16,62 ccm	3,65 % 17,04 ccm	0,975	2h 11' nach d. Zuckereinführung. Urin: Zucker +
subcutan				**Glucose subcutan**				
			22'	**429,6 ccm 20,3° 724,5**	**3,59 % 13,34 ccm**	**3,89 % 14,8 ccm**	**0,922**	**1h 38' n. Einführung von 98 g Zucker in 30 ccm H_2O. Urin: Zucker +**
4,79 % 19,85 ccm	**0,848**	**1h 27' n. Einführ. v. 15,9 g Zucker i. 49 ccm Wasser**	**20'**	**471,6 ccm 20,09° 745,4**	**3,86 % 16,24 ccm**	**4,38 % 18,43 ccm**	**0,881**	**2h 39' n. Einführung des Zuckers. Urin: Zucker +**
Adrenalin subcutan				Glucose per os, Adrenalin subcutan				
3,51 % 12,16 ccm	0,857	1h 7' n. Einführg. von 20 g Zucker in 60 ccm H_2O. 0,9 ccm Adrenal.	26'	374,6 ccm 19,1° 745,5	3,17 % 10,64 ccm	3,58 % 12,02 ccm	0,877	2h 6' nach der Zucker- und Adrenaleinführung. Urin: Zucker +
4,54 % 28,51 ccm	0,812	1h 17' n. Einführ. von 24 g Zucker in 73 ccm H_2O. 2,5 ccm Adrenal.	18'	598,2 ccm 21,05° 741,4	3,89 % 20,55 ccm	4,88 % 25,25 ccm	0,814	1h 51' nach d. Zucker- und Adrenaleinführung. Urin: Zucker +
			17'	628 ccm 19,3° 733,4	3,48 % 19,25 ccm	4,06 % 22,46 ccm	0,857	2h 1' n. Einführung von 19,8 g Zucker in 62 ccm H_2O und Adrenalin. Urin: Zucker +
			18'	567,5 ccm 19,04° 737,4	3,42 % 17,21 ccm	4,52 % 22,75 ccm	0,756	2h 24' n. Einführung von 18 g Zucker in 48 ccm H_2O. 3 ccm Adrenalin. Urin: Zucker +
				Glucose subcutan, Adrenalin subcutan				
			15'	476,1 ccm 18,36° 751,4	3,25 % 14,04 ccm	4,0 % 17,3 ccm	0,812	2h 4' n. Einführung von 9 g Zucker in 24 ccm H_2O. 0,8 ccm Adrenalin. Urin: Zucker +

Tabelle I.

Nr. Gewicht des Tieres Datum	Dauer	Atemvolum pro 1' Temp. Bar.	CO_2-Produkt. pro 1'	O_2-Verbrauch pro 1'	RQ	Bemerkungen	Dauer	Atemvolum pro 1' Temp. Bar.	CO_2-Produkt. pro 1'
Adrenalin subcutan							Adrenalin subcutan,		
16. 1550 g 17. IV.	29'	385,5 ccm 18,92° 748,5	3,43% 11,91 ccm	4,38% 15,21 ccm	0,783	1,6 g Uretan 1h 35' nach 1 ccm Adrenalin. Harn: Zucker +			
17. 2750 g 19. IV.	10'	1078,8ccm 20,16° 745,4	2,24% 21,06 ccm	2,87% 26,98 ccm	0,781	4 g Uretan 1h3' nach 1,5 ccm Adrenalin. Urin: Zucker +	10'	978,4 ccm 19,02° 745,4	2,72% 23,86 ccm

genügt vollständig diese Störung der Glykolyse. So kann man damit, wie wir sehen werden, ungezwungen die Hyperglykämie und Glucosurie erklären. Einige Beobachtungen über die Adrenalinwirkung können überhaupt nur durch diese Eigenschaft des Adrenalins erklärt werden. Hierher sind die Versuche von Pollak[1]) und Eppinger, Falta, Heß[2]) zu rechnen. Pollak hat nämlich festgestellt, daß vollständig glykogenfreie Strychnin-Hunger-Kaninchen auf Adrenalin mit Hyperglykämie und Glucosurie reagieren. Schon die erste Adrenalineinspritzung führt zur Glucosurie, obwohl die von diesem Autor weiter beobachtete Glykogenneubildung für die Erklärung des Auftretens der Hyperglykämie zu dieser Zeit sicher nicht herangezogen werden kann. Die glykogenmobilisierende Theorie der Adrenalinwirkung kann dieses Verhalten nicht erklären.

Eppinger, Falta und Heß haben bei pankreaslosen Tieren auf der Höhe der hervorgerufenen Störungen, wo also auch kein Glykogen mehr vorhanden war, durch Adrenalin eine Steigerung der Glucosurie bewirken können. Auch dafür gibt die Glykogenmobilisierung keine Aufklärung, da überhaupt kein Glykogen zur Verfügung stand.

Wir wollen nun diejenigen Beobachtungen in Betracht ziehen, die am stärksten für die glykogenmobilisierende Wir-

---

[1]) Pollak, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61.

[2]) Eppinger, Falta, Heß, Zeitschr. f. klin. Med. 67 u. 68.

(Fortsetzung).

O_2-Verbrauch pro 1'	RQ	Bemerkungen	Dauer	Atemvolum pro 1' Temp. Bar.	CO_2-Produkt. pro 1'	O_2-Verbrauch pro 1'	RQ	Bemerkungen
Glucose per os								
3,44% 30,18 ccm	0,791	2h 25' nach Adrenalin 1h 5' n. Einführg. von 20 g Zucker in 54 ccm H_2O. Urin: Zucker +						

kung des Adrenalins zu sprechen scheinen. Es ist nämlich ein gewisser Zusammenhang zwischen der Adrenalinwirkung und dem Glykogenbestand der Tiere. Daß Glykogenvorrat keine absolute Bedingung für das Zustandekommen der Adrenalinwirkung sein kann, ergibt sich aus den eben besprochenen Versuchen von Pollak und Heß, Eppinger und Falta; auch Doyon, Morel, Kareff[1]) haben bei pankreaslosen Hunden nach Adrenalin eine Steigerung des Blutzuckers gesehen, immerhin ist aber nach den Versuchen von Paton[2]), Gatin-Gruzewska[3]), Agadschanianz[4]) u. a. als sicher anzunehmen, daß sowohl die Glucosurie bei glykogenreichen Tieren stärker ist als bei glykogenarmen, als auch, daß die Adrenalinwirkung eine Glykogenverarmung der Leber nach sich zieht.

Dieses Verhalten des Glykogens wie überhaupt die Art der Adrenalinwirkung könnte nun folgendermaßen dem Verständnis nähergebracht werden.

Wir wissen, daß physiologischerweise im Falle, daß durch gesteigerten Zuckerverbrauch (Arbeit, Krämpfe) das Blut an Zucker zu verarmen droht, der Organismus durch gesteigerten

---

[1]) Doyon, Morel, Kareff, Compt. rend. Soc. Biol. **1905**.

[2]) Drummond und Paton, Journ. of Physiol. **31**.

[3]) Gatin-Gruzewska, Compt. rend. Soc. Biol. **1** und Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **142**.

[4]) Agadschanianz, diese Zeitschr. **2**.

Tabelle II.

Veränderungen des RQ

Nach Glucose					Nach Glucose und Adrenalin				
Nummer des Versuchs	von	auf	Differenz in % des Nüchternwertes	Bemerkungen	Nummer des Versuchs	von	auf	Differenz in % des Anfangswertes	Bemerkungen
3	0,786	0,980	+ 25	per os	5	0,884	0,877	− 0,1	Glucose per os, Adrenalin subcutan
4	0,843	0,975	+ 16	do.					
7	0,820	0,922	+ 12	subcutan	11	0,847	0,857	+ 1,3	do.
9	0,672	0,881	+ 31	do.	12	0,695	0,756	+ 8,8	do.
					13	0,801	0,812	+ 1,3	Glucose u. Adrenalin subcutan
					17	0,781	0,791	+ 1,3	Adrenalin subcutan, 1 Std. später Glucose per os
Mittel . . .			+ 21		Mittel . . .			+ 2,5	

Tabelle III.

Nummer, Gewicht des Tieres, Datum	Nahrung	Menge der eingeführten Glucose	Zeit der Blutentnahme	Blutzucker	Bemerkungen
18 2000 g 20. IV.	gelbe Rüben	12 g Zucker in 32 ccm Wasser subcutan	2h 30′ nach der Zuckereinführung	0,213%	Bestimmung nach Bertrand. (Moekl u. Frank, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65).
19 2700 g 20. IV.	gelbe Rüben	16 g Zucker in 42 ccm Wasser subcutan	2h 45′ nach der Zuckereinführung	0,49%	do.

Glykogenabbau und Zuckerzufuhr ins Blut den Blutzuckerspiegel auf gleicher Höhe zu erhalten pflegt. Bei der Wirkung des Adrenalins wird primär die glykolytische Kraft des Organismus vermindert, in einer Zeiteinheit wird weniger Zucker zersetzt als normal, der normale Blutzuckergehalt bedeutet unter diesen Umständen eine Verarmung des Blutes an Zucker im funktionellen Sinne. Dadurch treten, ähnlich wie bei Muskelarbeit, Mechanismen in Aktion, die eine stärkere Zufuhr von Zucker ins Blut bewirken. Die funktionelle Verarmung des Blutes an Zucker wird durch

Hyperglykämie ausgeglichen, die mechanisch dann die Glucosurie zur Folge hat.

Es ist klar, daß für das Zustandekommen der Hyperglykämie eine stärkere Zuckerbildung im Organismus die Vorbedingung ist. In erster Linie wird dazu das Glykogen benutzt. In dieser Weise wird es verständlich, daß das Adrenalin auf glykogenreiche Tiere stärker einwirkt (gemessen an der Intensität der Glucosurie) als auf glykogenarme, und daß die Tiere unter dem Einflusse des Adrenalins an Glykogen verarmen. Wenn aber kein Glykogen mehr vorhanden ist, wird anderes Material für die Zuckerbildung verwendet; so ist auch zu verstehen, daß die N-Zersetzung bei Adrenalin-Hungertieren gesteigert ist, bei gefütterten aber unverändert [Quest[1])].

Durch Verminderung der Glykolyse läßt sich auch in einfacher Weise die Wirkung des Adrenalins auf glykogenfreie Tiere (Pollak, Heß, Falt, Eppinger, Doyon) erklären, ebenso wie die Bedeutung des Adrenalins für andere Formen der Glucosurie [Starkenstein[2])].

Aus diesen Überlegungen wird ferner verständlich, warum der respiratorische Quotient der Adrenalintiere unter allen Umständen, also sowohl ohne wie mit Glucosefütterung, nur wenig von der Norm abweicht. Die Schädigung der Glykolyse wird nämlich durch größeres Zuckerangebot, Hyperglykämie, eben in diesem Maße kompensiert, um die Zuckerverbrennung in normalen Grenzen zu erhalten. Es ist auch nicht befremdend, daß es manchmal, besonders bei glykogenreichen Tieren, zur Überkompensation kommen kann — vielleicht ist in diesem Sinne der Versuch 12 mit einer Steigerung des RQ um 8,8% zu erklären und einige von Harri gefundene Werte.

Die bis nun angenommene Zuckermobilisierung durch Adrenalin wäre demnach eine sekundäre Wirkung, eine Abwehrreaktion des Organismus auf die primäre Schädigung der Glykolyse.

Über den Mechanismus dieser Störung in den glykolytischen Prozessen ist auf Grund der angeführten Versuche schwer etwas auszusagen, zumal wir überhaupt über Art und Ort dieser

---

[1]) Quest, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 5.

[2]) Starkenstein, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 18.

Prozesse nur sehr wenig unterrichtet sind. Vielleicht ist es die Verengerung der Gefäße [Ritzmann[1]), Harri], die eine schlechtere Atmung der Zellen oder gewisse Änderungen ihres physikalisch-chemischen Zustandes hervorruft, die ihrerseits die Ursache einer verminderten Glykolyse abgeben.

Für die glykolysestörende Wirkung des Adrenalins seien noch folgende Versuche angeführt, die, zu anderen Zwecken ausgeführt, doch den Ausgangspunkt für das vorliegende Studium gegeben haben. Wenn nämlich Adrenalinkaninchen während der schon ausgebildeten Adrenalinwirkung Zuckerlösungen in die Ohrvene gespritzt wurden, so ist der Zucker quantitativ im Harn wieder erschienen.

Tabelle IV.

(Diese Versuche wurden im pharmakologischen Institut der Universität Lemberg ausgeführt.)

Nummer, Gewicht, Nahrung des Kaninchens	Datum	Glucose intravenös	Adrenalin subcutan	Urin	Bemerkungen
42 1450 g Gelbe Rüben	14. XII. 1911	1,4 g in 7 ccm Wasser	—	zuckerfrei	—
	15. XII.	—	1 ccm Adrenalin	190 ccm mit 3,8 g Zucker	—
	17. XII.	1,4 g in 7 ccm Wasser	1 ccm Adrenalin	548 ccm mit 5,4 g Zucker	Die Zuckereinspritzung 1h 30′ nach der Adrenalineinspritzung
40 2100 g Gelbe Rüben	21. XII. 1910	—	1 ccm Adrenalin	176 ccm mit 2,6 g Zucker	—
	22. XII.	1,4 g in 7 ccm Wasser	1 ccm Adrenalin	258 ccm mit 4,4 g Zucker	Wie bei 42
41 2350 g Gelbe Rüben	21. XII. 1910	—	1 ccm Adrenalin	141 ccm mit 3,54 g Zucker	—
	22. XII.	1,4 g in 7 ccm Wasser	1 ccm Adrenalin	176 ccm mit 4,98 g Zucker	Wie bei 42

Bei normalen Tieren wird der intravenös eingeführte Zucker bis auf Bruchteile gänzlich verbrannt [Brasol[2]), Blumenthal[3])]; auch pankreaslose und Phlorizintiere verbrennen fast vollständig

[1]) Ritzmann, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61.
[2]) Brasol, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1884 (physiol. Abt.).
[3]) Blumenthal, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6.

Tabelle V.

Nummer, Gewicht, Nahrung des Kaninchens	Datum	Glucose intravenös	Glucose per os	Urin	Bemerkungen
20 2000 g Gelbe Rüben	17. IV.	—	15 g in 40ccm Wasser	zuckerfrei	—
	18. IV.	1,4 g in 10 ccm Wass.	—	unbestimmbare Spuren von Zucker	—
	19. IV.	do.	15 g in 40ccm Wasser	do.	Die Zuckerinjektion 2h 30' nach dem Zucker per os
21 2700 g Gelbe Rüben	17. IV.	—	24 g in 64ccm Wasser	zuckerfrei	—
	18. IV.	2,3 g in 10 ccm Wass.	—	Spuren von Zucker	—
	19. IV.	do.	24 g in 64ccm Wasser	92 ccm mit 0,55 g Zucker	Wie bei 20

den intravenös eingeführten Zucker [G. Rosenfeld[1])]. Ebenso verhalten sich Kaninchen, die ihre Glykogendepots vermittels oraler Zuckerzuführung überfüllt haben und nach eigenen Versuchen zu dieser Zeit sicher hyperglykämisch sind[2]) [Tab. V].

Es ist nicht denkbar, die quantitative Ausscheidung des intravenös eingeführten Zuckers durch die mobilisierende Eigenschaft des Adrenalins zu erklären, denn bei ungestörter Glykolyse müßte wenigstens ein Teil von diesem Zucker der Glykolyse anheimfallen und der Ausscheidung durch den Harn entgehen.

Wir wollen aus den angeführten Versuchen und Überlegungen keine weiteren Schlüsse für die Lehre vom menschlichen Diabetes ziehen, immerhin aber ist es auffallend, daß auch bei dieser Hyperglykämie der Einfluß der höheren Blutzuckerkonzentration auf den respiratorischen Quotienten nicht zum Ausdruck kommt [Magnus-Levy[3]) u. v. a.]. Besonders bemerkenswert sind diesbezüglich die Versuche von Nehring und Schmoller[4]). Diese Forscher haben mittelschweren Dia-

[1]) G. Rosenfeld, Berl. klin. Wochenschr. 1907 u. 1908.
[2]) Wilenko, l. c.
[3]) Magnus-Levy, Zeitschr. f. klin. Med. 56.
[4]) Nehring und Schmoller, Zeitschr. f. klin. Med. 31.

betikern größere Mengen Glucose zugeführt; der größte Teil der Glucose ist dann wieder im Harn ausgeschieden worden, mußte also die Glykämie beim Passieren des Blutes sicher gesteigert haben — der respiratorische Quotient ist trotzdem unverändert geblieben.

Zusammenfassung.

1. Das Adrenalin verändert bei Kaninchen den Nüchtern-RQ nicht oder nur wenig.

2. Das Adrenalin setzte in unseren Versuchen die physiologische Steigerung des RQ nach Zufuhr von Kohlenhydraten fast gänzlich herab.

3. Intravenös eingeführte Glucose erscheint bei Adrenalintieren quantitativ im Harn wieder.

4. Das Adrenalin vermindert die Fähigkeit des Organismus, Kohlenhydrate zu verbrennen.

Untersuchungen über die Beziehung der Geschlechtsdrüsen zum Kalkstoffwechsel.

Von

Felix Reach.

(Aus dem physiologischen Institut der k. k. Hochschule für Bodenkultur in Wien.)

(Eingegangen am 8. Mai 1912.)

Mannigfache Erfahrungen deuten auf Beziehungen zwischen der Tätigkeit der Geschlechtsdrüsen und dem Mineralstoffwechsel, insbesondere dem des Skeletts. Hierher gehören einerseits die Beobachtungen, die man an menschlichen und tierischen Kastraten gemacht hat, andererseits klinische Erfahrungen. Speziell die Tatsache, daß die Osteomalacie durch Ovariektomie häufig günstig beeinflußt wird, hat die Diskussion dieses Problemenkomplexes in Fluß gebracht. Es soll an dieser Stelle die umfangreiche Literatur nicht referiert werden, und es dürfte das um so weniger notwendig sein, als für die Gebiete der Biochemie und der Stoffwechsellehre in den letzten Jahren eine ganze Reihe vortrefflicher Zusammenfassungen erschienen sind. In Hinsicht auf die uns hier beschäftigenden Fragen kommen sie meist zu dem Schlusse, daß das vorliegende Beobachtungsmaterial sich vielfach widerspricht und zur Beantwortung vieler Fragen unzulänglich ist.

Eine Hypothese erscheint besonders bestechend. Wenn man sich vorstellt, daß die Geschlechtsdrüsen schon normalerweise ebenso wie andere Drüsen mit innerer Sekretion die Stoffwechselvorgänge direkt beeinflussen, dann erscheint es vom teleologischen Standpunkte aus besonders annehmbar, daß sich diese Wirkung auf die mineralischen Bestandteile des Skeletts erstreckt. Dies gilt wenigstens für das weibliche Geschlecht.

Während der Schwangerschaft ist für die Skelettbildung der neuen Generation eine relativ beträchtliche Menge von Calcium erforderlich. Während der Lactationsperiode bedarf der kindliche Organismus ebenfalls große Mengen dieser Substanz zum Fortschreiten der Knochenbildung, und die Milch, in der er diese wie alle anderen Nahrungsbestandteile erhält, gehört in der Tat zu den Ca-reichen Nahrungsmitteln. Wir wissen auch aus verschiedenen Beobachtungen, daß sowohl während der Gravidität als während der Lactation der mütterliche Organismus im Falle des Bedarfes seine eigenen Bestände angreift, um die zum Aufbau des neuen Organismus nötigen Stoffe liefern zu können. Ferner wissen wir, daß es in der Schwangerschaft des Menschen eine physiologische Erweichung der Knochen gibt, die sich insbesondere auf das Becken[1]) bezieht, und auch dieser Umstand läßt sich teleologisch wohl verstehen. Dieser Gedankengang im Zusammenhang mit den Erfahrungen bei der puerperalen Osteomalacie führt zu der Annahme, daß diese Erkrankung eine besondere pathologische Steigerung einer normalen Funktion des Ovariums ist. Man kommt so leicht zu der Hypothese, daß das innere Sekret der Geschlechtsdrüsen die Mobilisierung von Kalkverbindungen veranlaßt, daß zur Gravidität eine physiologische, zur Osteomalacie eine durch ihre Intensität pathologische Steigerung dieser Funktion gehöre.

Es ist indessen diese Anschauung keineswegs frei von Bedenken, und, was die Hauptsache ist, sie hat sich bisher nicht experimentell erhärten lassen. Es soll hier nicht auf die zahlreichen Stoffwechselversuche an kastrierten Menschen und Tieren eingegangen werden, hingegen dürfte es mit Hinsicht auf die gleich zu berichtenden eigenen Versuche am Platze sein, einige Worte über jene Untersuchungen zu sagen, die den chemischen Vergleich kastrierter und normaler Tiere zum Gegenstand haben. Den angeführten Hypothesen entsprechend wäre zu erwarten, daß die kastrierten Tiere einige Zeit nach der Operation kalkreicher sind. Untersuchungen solcher Art sind überdies keineswegs sehr häufig ausgeführt worden. Lüthje[2]) hat je einen männlichen und weiblichen Hund kastriert und, abgesehen von

[1]) Hanau, Fortschritte der Medizin, 1892.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 50, 1903.

den Bilanzversuchen, die Körpersubstanz mit der zweier entsprechender Kontrolltiere verglichen. Er konnte keinen Einfluß der Kastration auf die Zusammensetzung der Körpersubstanz feststellen. Felix Heymann[1]) hat vier weibliche Ratten kastriert und sie mit vier Normaltieren hinsichtlich ihres Phosphorgehaltes verglichen. Wie nicht anders möglich, schwanken auch bei den Normaltieren die Werte einigermaßen. Heymanns Zahlen zeigen aber, daß eine auffällige Abweichung im Phosphorgehalte des Skeletts gerade bei jenen Kastraten auftritt, die nach der Kastration am längsten am Leben erhalten wurden. Die vier Tiere Heymanns lebten 41, 51, 88 und 126 Tage nach der Kastration und es zeigte sich, daß gerade die letzten beiden Tiere auffallend wenig Phosphor enthielten. Eine Beobachtung, die also den oben angeführten, heute weit verbreiteten Anschauungen direkt widerspricht. Indes kommen auch bei den Normaltieren Heymanns, wie nicht anders zu erwarten, ziemliche Schwankungen vor. Bei der geringen Anzahl von Tieren läßt sich daher nicht mit Sicherheit sagen, ob die beobachteten niedrigen Werte nicht noch in die Variationsbreite fallen.

Die eigenen Untersuchungen wurden an weißen Mäusen angestellt. Die Verwendung solcher kleiner Versuchstiere hat den Vorteil, daß die Beobachtungszeit minder lang zu sein braucht. Man muß sich vor Augen halten, daß ein Tag in dem Stoffwechselleben eines so kleinen Tieres ebensoviel bedeutet, wie ein großes Vielfaches dieser Zeit für den Menschen. Eine Maus kann unter Umständen in 24 Stunden eine Nahrungsmenge von der Größe ihres Körpergewichts verarbeiten. Beim Hunger nimmt sie in einem Tage leicht um 10% ihres Körpergewichts ab. In 21 Tagen trägt eine weibliche Maus eine größere Anzahl von Jungen und binnen kurzer Zeit liefert sie ihnen dann in der Milch das weiterhin zur Ergänzung des Skeletts nötige Calcium. Ferner haben solche kleine Tiere den Vorteil, daß man bei ihrer Analyse nicht Proben der Körpersubstanz, sondern das ganze Tier verarbeitet. Endlich ist es auch aus rein äußeren Gründen dort, wo es sich um die Haltung einer größeren Anzahl von Tieren handelt, nötig,

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 1904.

kleine Tiere zu nehmen. Ein Teil der Tiere wurde im Frühjahr und Sommer 1911 kastriert und bis zum August mit Semmel und reichlich Milch gefüttert. Die Zeit, die die Tiere, über die berichtet wird, nach der Kastration noch lebten, schwankte zwischen 42 und 108 Tage, und beträgt im Mittel $74^1/_2$ Tage. Es hätten also auch diejenigen, die am kürzesten nach der Kastration lebten, noch immer die Zeit gehabt, zwei neue Würfe zur Welt zu bringen. Dabei erhielten sie während dieser ganzen Zeit in der Milch ein sehr Ca-reiches Futter. Die Kontrolltiere wurden im Herbst und Winter 1911 bis 1912 ungefähr ebenso lange bei der gleichen Kost gehalten. Nur bei fünf Tieren (Nr. 67 bis 71 der Tabelle) war diese Fütterungszeit eine kürzere. Bei den Normaltieren waren stets die Geschlechter getrennt, damit eine Gravidität vermieden werde, während der Fütterungszeit wurde durch periodische Wägungen das Gedeihen der Tiere kontrolliert. Spontan eingegangene Tiere wurden in den Bericht nicht aufgenommen. (Daraus und aus einigen verloren gegangenen Analysen erklärt es sich, daß die in der Tabelle beibehaltene Originalnumerierung höhere Zahlen zeigt als nach der Gesamtzahl der Berichtstiere zu erwarten wäre.) Das Untersuchungsmaterial war natürlich nicht so gleichmäßig wie das Lüthjes, der vier Tiere eines Wurfes verwendete. Es war jedoch ein recht gleichmäßiges. Männchen und Weibchen stammten aus gleichen Zuchten. Daß alle Tiere die erste Jugend überschritten, aber keineswegs alte Tiere waren, folgt schon aus den Körpergewichtszahlen. Junge weiße Mäuse, die die Saugperiode hinter sich haben und schon alles fressen, wiegen anfangs nur 5 g und weniger, andererseits erreichen die weißen Mäuse, wenn sie mehrere Jahre alt werden, viel höhere Gewichte als unsere Tiere hatten. Große Unterschiede im Fettgehalt bestanden sicher auch nicht. Daß hier und da von einem Schwanze ein Stückchen fehlte, war eine so unbedeutende Läsion, daß es wohl weiter nicht berücksichtigt zu werden brauchte. Zum Schlusse der Fütterungszeit wurden alle Tiere für 24 Stunden auf Hunger gesetzt, damit die Füllung des Darmkanales die Resultate nicht trübe. Die Tiere wurden dann mit Äther getötet, gewogen und gemessen. Als Körperlänge ist in den Tabellen der Abstand der Schnauzenspitze von der Schwanzwurzel angegeben. Jedes Tier einzeln

wurde der feuchten Veraschung nach Neumann unterworfen, und der Ca-Gehalt bestimmt. (Über Magnesiumbestimmungen hoffe ich nach Vergrößerung des Materials in kurzem berichten zu können.)

Die Resultate sind im einzelnen in der Tabelle niedergelegt. Die Versuchstiere zerfallen in vier Gruppen: A. I. Nor-

A. Normaltiere. **B. Kastraten.**

I. Weibchen.

Nr.	Körperlänge mm	Gewicht g	CaO-Gehalt mg	CaO-Gehalt Prozente des Körpergewichts	Nr.	Körperlänge mm	Gewicht g	CaO-Gehalt mg	CaO-Gehalt Prozente des Körpergewichts
45	83	15,2	154,9	1,02	19	80	14,05	110,7	0,79
46	78	13,55	219,6	1,62	20	78	17,45	253,3	1,45
47	75	13,65	230,2	1,68	21	84	15,25	232,7	1,52
48	78	15,40	182,6	1,19	22	79	13,03	182,8	1,40
54	70	13,55	154,5	1,14	26	83	18,11	244,7	1,35
55	71	14,45	185,5	1,28	27	70	18,4	190,4	1,04
56	71	13,15	158,8	1,21	28	79	21,11	250,6	1,19
65	75	18,40	212,0	1,15	30	81	14,83	171,2	1,15
66	72	14,65	185,2	1,26	38	87	14,77	264,4	1,15
					41	79	14,82	175,6	1,18
					42	88	15,55	181,1	1,17
					43	77	12,77	209,6	1,64
					44	82	13,43	200,4	1,54
Mittel (9)	74,7	14,67	187,0 (133,6 mg Ca)	**1,283** ± 0,049 (0,917 % Ca)	Mittel (13)	80,6	15,66	205,1 (146,5 mg Ca)	**1,275** ± 0,039 (0,911 % Ca)

II. Männchen.

49	79	18,3	209,7	1,14	24	76	16,95	188,0	1,11
51	78	17,3	223,9	1,29	25	77	17,96	195,9	1,11
52	72	17,45	233,8	1,34	29	81	15,40	192,1	1,25
53	70	14,45	209,7	1,45	31	78	14,70	111,2	0,76
58	75	17,85	153,9	0,86	32	89	16,47	156,9	0,95
59	81	18,4	159,7	0,87	33	85	19,23	168,2	0,875
60	83	18,95	163,4	0,86	34	85	17,28	183,1	1,06
61	92	21,35	212,9	1,00	35	82	17,08	160,9	0,94
62	81	20,05	173,8	0,87	36	83	16,10	117,8	0,73
63	77	16,25	251,5	1,54	37	83	18,72	173,7	0,93
64	71	20,2	201,0	1,00	39	87	17,45	239,0	1,35
67	78	12,1	154,0	1,26					
68	73	12,5	159,8	1,26					
69	75	12,5	178,1	1,42					
70	80	16,2	216,0	1,33					
71	76	12,9	179,6	1,39					
Mittel (16)	77,6	16,66	192,5 (137,5 mg Ca)	**1,180** ± 0,040 (0,843 % Ca)	Mittel (11)	82,8	17,03	171,5 (122,5 mg Ca)	**1,005** ± 0,039 (0,718 % Ca)

male Weibchen, A. II. Normale Männchen, B. I. Kastrierte Weibchen, B. II. Kastrierte Männchen. Von jedem Tiere ist außer Körperlänge und Gewicht der absolute und der relative CaO-Gehalt angegeben. Bei den Mittelzahlen für den Prozent-Gehalt des Körpers an CaO ist jedesmal der „wahrscheinliche Fehler des Mittels“ [1]) als Fehlergrenze angegeben. Die Betrachtung der Werte zeigt zunächst für das Mittel des relativen CaO-Gehalts bei den normalen und kastrierten Weibchen fast identische Zahlen. Sowohl bei den Normalen wie bei den Kastraten zeigt sich ferner ein deutlicher Unterschied im Kalkgehalt zugunsten der Weibchen. Der Unterschied ist so groß, daß er sicherlich nicht ganz auf Zufälligkeiten oder Versuchsfehler zurückgeführt werden kann. Eine genauere Betrachtung der Zahlen für die kastrierten Tiere muß hier insbesondere den Zweifel ausschließen und führt den Unterschied wohl noch deutlicher vor Augen als die errechneten Fehlergrenzen. Obzwar die Männchen meist schwerer und größer sind, zeigt sich der genannte Unterschied doch schon sehr deutlich in den absoluten Zahlen. Nur einmal (Nr. 39) findet sich beispielsweise bei den Männchen der jetzt speziell betrachteten Gruppe B ein Gesamt-CaO-Gehalt von mehr als 200 mg, während bei den kastrierten Weibchen sogar das Mittel aller 13 Tiere 205 ist. Noch stärker drückt sich natürlich der Unterschied in den Prozentzahlen aus. Man beachte, wie oft bei den Männchen Werte unter 1 % vorkommen, während sich ein derartiger prozentiger Gehalt von allen Weibchen nur bei einem, ganz aus der Reihe fallenden Tiere (Nr. 19) findet. Etwas weniger deutlich als bei den kastrierten Tieren ist der Unterschied bei den Normaltieren. Hierzu ist jedoch zu bemerken, daß von den fünf normalen Männchen Nr. 67 bis 71, die, wie erwähnt, etwas kürzere Zeit im Laboratorium gehalten waren als die andern, vier Tiere bei ungefähr derselben Länge ein auffallend niedriges Gewicht haben, sie waren offenbar etwas weniger gut genährt und es erscheint zum Teil deshalb der prozentige CaO-Gehalt für die ganze Gruppe dieser Tiere etwas erhöht. Unter Weg-

[1]) $0{,}6745 \sqrt{\frac{\Sigma(v^2)}{n(n-1)}}$, worin v die einzelne Abweichung vom Mittel und n die Anzahl der Fälle bedeutet.

lassung dieser Gruppe würde das Mittel in der letzten Rubrik bei der Gruppe der normalen Männchen heißen: $1{,}111 \pm 0{,}051$. Insbesondere aber die Betrachtung der einzelnen Zahlen zeigt auch hier wiederholt Werte von beträchtlich weniger als $1\,\%$, was in der Gruppe der normalen Weibchen nicht vorkommt. Wir haben es also hier offenbar mit einem sekundären Geschlechtscharakter zu tun, der darin besteht, daß die Weibchen dieser Tiere kalkreicher sind als die Männchen.

Außerdem bleibt aber, selbst wenn man, wie oben angeführt, die letzten fünf normalen Männchen wegläßt, beim männlichen Geschlecht ein deutlicher Unterschied zwischen normalen Tieren und Kastraten bestehen, und zwar in dem Sinne, daß die Kastraten kalkärmer sind. Hypothesen, wie die eingangs erwähnten, haben also durch das Experiment ganz und gar keine Bestätigung gefunden.

Was die Erklärung des erstgenannten Befundes, des Unterschiedes der Geschlechter, anlangt, so ist er wenigstens vom teleologischen Standpunkte aus leicht zu verstehen. Wie oben ausgeführt, kommt eben das Weibchen leicht in die Lage, ihren Kalkbestand im Interesse der neuen Generation angreifen zu müssen. Schwerer zu erklären ist der zweite Befund, der geringere Kalkgehalt bei den kastrierten Männchen gegenüber den nicht kastrierten. Es ist jedenfalls seltsam, daß ein Geschlechtsunterschied durch die Kastration noch deutlicher wird. Man geht vielleicht nicht fehl, wenn man den Rückgang im Kalkgehalt nicht als den Ausfall einer spezifischen Funktion der Hoden, sondern als eine allgemeine Ernährungsstörung auffaßt. Warum aber diese Ernährungsstörung gerade beim männlichen Geschlechte auftritt, bleibe unbeantwortet.

Die mitgeteilten Zahlen können auch von andern Gesichtspunkten aus von Interesse sein. Zum Vergleiche des Gesamt-CaO-Gehaltes verschiedener Säuger diene die nachfolgende Zusammenstellung.

Ochs	(fett)	2,111 % CaO
„	(halbfett)	1,792 „ „
Kalb	(fett)	1,646 „ „
Schaf	(mager)	1,321 „ „
„	(halbfett)	1,350 „ „
„	(fett)	1,184 „ „
„	(sehr fett)	1,240 „ „

Lamm (fett)	1,281 % CaO
Schwein (mager)	1,079 „ „
„ (fett)	0,636 „ „
Neugeborener Hund	0,66 „ „
Menschlicher Foetus, Ende der Schwangerschaft	1,380 „ „
Neugeborener Mensch	1,075 „ „
Erwachsener „ ca. . . .	2,5 „ „
Männliche Mäuse	1,180 „ „
Weibliche Mäuse	1,283 „ „

Der Wert für den Erwachsenen ist nach verschiedenen Angaben berechnet, die sich teils in der Zusammenstellung Vierordts[1], teils bei Albu und Neuberg[2] finden. Der Wert für den Neugeborenen ist aus der Zusammenstellung Tangls[3] berechnet. Die Zahl für den menschlichen Foetus entstammt einer diesbezüglichen Untersuchungsreihe von Michel[4]. Die Asche des neugeborenen Hundes hat Bunge[5] untersucht. Die Angaben über die landwirtschaftlichen Nutztiere sind von E. Wolff und ebenfalls der Tanglschen Zusammenstellung entlehnt. Man ersieht, daß unsere weißen Mäuse dem neugeborenen Menschen oder dem Schwein hinsichtlich des CaO-Gehaltes am ähnlichsten sind.

[1]) H. Vierordt, Anat. physiol. Daten u. Tabellen. 3. Aufl., Jena, 1906.
[2]) Albu u. Neuberg, Physiol. u. Pathol. d. Mineralstoffwechsels, 1906.
[3]) In Oppenheimer, Handb. d. Bioch. **3**, 2. Teil.
[4]) Compt. rend. Soc. Biol. 1899.
[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**, 400, 1899.

Die wirksame Substanz des Opiumrauches.

Von

Paul Pott.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 11. Mai 1912.)

Mit 2 Figuren im Text.

Obwohl in der Literatur eine große Zahl von Arbeiten vorliegt, die sich mit der Frage beschäftigten, welche Substanzen im Rauche des Rauchopiums die so eigenartige Wirkung auf den menschlichen Organismus auszuüben imstande sind, ist diese doch immerhin wichtige Frage bisher noch nicht einwandfrei beantwortet worden. Beim Studium der hierfür einschlägigen Literatur gewinnt man den Eindruck, daß sich zwei Ansichten sehr schroff gegenüberstehen. Nach der Ansicht der einen Forscher handelt es sich bei der Wirkung des Rauchopiums um das im Opium quantitativ am stärksten vertretene Alkaloid — das Morphin. Diese Annahme hat ja von vornherein viel für sich; ist doch die Wirkung des Morphins in vieler Beziehung auffallend ähnlich der Wirkung des Rauchopiums. Von den diese Ansicht vertretenen Autoren seien nur einige wenige erwähnt.

So hat Laland[1]) den beim Verbrennen des Rauchopiums entstehenden Rauch in einer Vorlage von 3 Flaschen aufgefangen und dann aus dem Morphingehalte des verwendeten Tschandus, des Rückstandes und der aufgefangenen Dämpfe die Menge des in Wirklichkeit resorbierten Alkaloides festgestellt. Auf diese Weise ist es ihm gelungen, im Verlaufe mehrerer Tage eine hinreichend große Dosis Morphin aufzufangen, so daß ihm auf chemischem Wege die Identifizierung dieser

[1]) E. Laland, Opium des fumeurs. Arch. de Médicine navale et coloniale. Paris 1890, Heft 7 bis 9.

Substanz möglich war. Auch Moissan[1]), der sich mit dieser Frage eingehend beschäftigte, kommt ebenfalls zur Ansicht, daß das Morphin, das beim Rauchen mit den Wasserdämpfen mitgerissen wird, soweit es nicht durch die hohe Temperatur, die Moissan bei seinen Versuchen anwendete, zersetzt wird, an der charakteristischen Wirkung des Rauchopiums den Hauptanteil hat.

Zu ganz anderen Resultaten kam Nikolaus Simon[2]) in seiner Inauguraldissertation „Über die Darstellung und Zusammensetzung von Rauchopium sowie über die im Opiumrauche wirksamen Stoffe". In dieser äußerst eingehenden und ausführlichen Arbeit kommt Simon zu dem Schlusse, daß das Morphin und das Narkotin an der Wirkung des Rauchopiums nicht beteiligt sind, sondern die Zersetzungsprodukte dieser Substanzen. Als Hauptzersetzungsprodukte, die bei der Wirkung in Betracht kommen, sieht Verfasser Pyrrol, Pyridin sowie eine Reihe höherer Pyridinbasen an.

Endlich sei noch in Kürze einer Arbeit Erwähnung getan, in der in sehr gesuchter Weise die Wirkung des Rauchopiums erklärt zu werden versucht wird. Es ist dies die Arbeit von Weichardt und H. Stadlinger[3]), die zu folgenden Schlußsätzen kommen:

1. Eiweißabspaltungsantigen von Ermüdungstoxincharakter ist sowohl durch seine biologischen Wirkungen als auch durch einen spezifischen Antikörper gekennzeichnet.

2. Eiweißabspaltungsantigen von Ermüdungstoxincharakter findet sich nicht nur im Tierreich, sondern auch im Pflanzenreich, z. B. im Opium.

3. Aus letzterem kann es nach vorheriger Entfernung der Alkaloide und mittels der Dialyse rein gewonnen werden.

4. Ein Teil der komplexen Wirkung des Opiums dürfte auf die Anwesenheit dieses Antigens zurückzuführen sein.

Ich habe nun im Sommersemester 1911 im pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br. auf Anregung von Prof. W. Straub diese Frage neuerdings in Angriff genommen, in der Hoffnung, den einwandfreien Nachweis zu erbringen, daß die Wirkung des Rauchopiums in erster Linie auf die Anwesenheit des im Opiumrauche noch nicht zur Zersetzung gelangten Morphins zurückzuführen sei. Während jedoch bisher der Hauptwert darauf gelegt wurde, das Morphin im Opiumrauche auf chemischem Wege zu identifizieren, ein

---

[1]) Moissan, Journ. de Pharmacie et Chimie **2**, 58, 1895.

[2]) N. Simon, Über Darstellung und Zusammensetzung von Rauchopium sowie die im Opiumrauche wirksamen Stoffe. Inauguraldissertation, Bern 1903.

[3]) H. Stadlinger und Weichardt, Über Opiumtoxine. Diese Zeitschr. **8**, 1907.

Unternehmen, das bei den geringen Mengen, um die es sich dabei meist handelte, und bei den höchst unsicheren, fast ausschließlich auf Farbenreaktionen beruhenden chemischen Reaktionen, auf große Schwierigkeiten stoßen mußte, so daß ein Versagen des chemischen Nachweises des Morphins noch lange nicht für die Abwesenheit des Morphins im Opiumrauche spricht, habe ich nun versucht, unter Anwendung der unvergleichlich empfindlicheren biologischen Methoden das Vorhandensein des Morphins im Rauche des Rauchopiums nachzuweisen.

Als biologische Methoden dienten mir:

1. die charakteristische Wirkung des Morphins auf die Erregbarkeit des Atemzentrums beim Warmblüter;

2. die neue, im verflossenen Jahre von W. Straub entdeckte biologische Methode zum Nachweis von Morphin an weißen Mäusen, eine eigenartige Reaktion, auf die ich noch später mit einigen Worten zurückzukommen haben werde. Diese Reaktion ist im hiesigen pharmakologischen Institute durch O. Herrmann bis ins Detail ausgearbeitet worden. Es hat sich dabei ergeben, daß diese Reaktion nicht bloß außerordentlich empfindlich, sondern vor allem charakteristisch und spezifisch für Morphin ist, da alle übrigen Alkaloide diese Reaktion nicht aufweisen.

Eigene Versuche.

I. Vorversuche: Sublimationsversuche mit Morphinum hydrochloricum.

Es mußte vor allem die Frage beantwortet werden, ob Morphin überhaupt und unter welchen Bedingungen sublimierbar ist, denn auch darin sind die bisherigen Ansichten geteilt.

Hellwig[1]) will Morphin als reines Alkaloid in mikroskopisch geringen Mengen durch bloßes Erhitzes auf dem Objektträger verflüchtigt und das erhaltene Sublimat mittels der Jodsäurereaktion als Morphin nachgewiesen haben, eine Reaktion allerdings, die nicht unter allen Umständen als für Morphin charakteristisch angesehen werden kann;

[1]) Hellwig, Die Sublimation des Alkaloides und ihre mikroskopische Verwendung für die differenzielle Diagnose derselben. Zeitschr. f. anal. Chem. 3, Wiesbaden 1864.

ferner hat Krafft[1]) Morphin im Kathodenlicht bzw. im Vakuum bei einer Temperatur von 190° zur Sublimation gebracht.

Auch Guy[2]) hat Morphin mittels der von ihm als Mikrokrystallisation bezeichneten Methode zur Sublimation gebracht bei einer Temperatur von 166°.

In einer sehr umfangreichen Arbeit hat endlich Kempf[3]) mittels einer von ihm angegebenen Apparatur eine große Anzahl chemischer Verbindungen im Vakuum auf ihre Sublimationsfähigkeit geprüft, darunter auch das Morphin. Bei seinen Versuchen mit Morphin fand er schon bei einer Temperatur von 150° den ersten Anflug eines Sublimates. Das anfänglich schwach gelb gefärbte Sublimat wurde noch zweimal bei etwas höheren Temperaturen sublimiert, bis schließlich eine völlig farblose Substanz, aus großen glasklaren Krystallen bestehend, resultierte. Hiermit wurde durch R. Kempf bewiesen, daß unter besonderen Versuchsbedingungen wirklich reines Morphin sich ohne jede Zersetzung selbst bei hoher Temperatur (220°) glatt sublimieren läßt. Den Schmelzpunkt des dreimal sublimierten Morphins fand Kempf bei 254°.

Anderer, gegenteiliger Ansicht ist der bereits schon früher zitierte N. Simon. Dieser Autor benutzte zur Sublimation des Morphins einen Apparat, wie ihn Moissan zur Destillation gebrauchte. Es wurden 25 g Morphin in trockenem Zustande in einer Retorte auf 300° erhitzt; als Vorlage diente eine 5%ige Salzsäurelösung. Bei 230° zeigte sich zunächst eine starke Rauchentwicklung, hierauf ging dann bei höherer Temperatur ein flüssiges bernsteinfarbiges Destillat über. Es wurde dann noch ein zweites Destillat bei einer Temperatur von 420° gewonnen und beide Destillate auf das Vorhandensein von Morphin geprüft, jedoch jedesmal mit negativem Resultate. Die Ursache des Versagens dieses Versuches dürfte wohl wahrscheinlich in der vom Verfasser von vornherein zu hoch gewählten Temperatur zu suchen sein.

Ich habe nun 1. die Versuche nach der Methode von Kempf, also unter Benutzung eines Vakuums bei Morphinum hydrochloricum wiederholt und dabei die Angaben von Kempf vollauf bestätigen können. Es ist mir in genauerer Ausführung beweisender Vorversuche von Prof. Straub aber 2. gelungen, ohne besondere Versuchsanordnung, d. h. ohne Benutzung eines luftverdünnten Raumes und unter Bedingungen, wie sie beim Opiumrauchen eingehalten werden, Morphin zur Sublimation zu bringen.

---

[1]) Krafft und Weilandt, Sublimationstemperatur beim Vakuum des Kathodenlichtes. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **1896** II, S. 22 bis 41.

[2]) Guy, Pharmaceut. Journal and Transaction **8**, 9.

[3]) R. Kempf, Praktische Studien über Vakuumsublimationen. Chem.-Zeitg. **1907**, 63; Journ. f. prakt. Chem. **78**, 201, 1909.

Die Versuchsanordnung war folgende: Ein Reagensglas wurde mit einer geringen Menge gut getrocknetem Morphinum hydrochloricum beschickt und an seinem oberen offenen Ende durch einen doppelt durchbohrten Kork geschlossen. Durch die eine dieser beiden Öffnungen wurde ein an seinem oberen Ende rechtwinklig abgebogenes dünnes Glasröhrchen, das an seinem unteren Ende zu einer feinen Capillare ausgezogen war, hindurchgesteckt; durch die andere Öffnung des Korkes ragte ein ebenfalls an seinem oberen Ende rechtwinkelig abgeknicktes kurzes Glasröhrchen in das Reagensglas hinein. Das Capillarröhrchen wurde nun mit einem Wasserstoffentwicklungsapparate in Verbindung gebracht und das ganze Reagensgläschen in einem „Heräusofen" auf bestimmte Temperaturen erhitzt. Dabei zeigte sich, daß schon bei 150° das Morphin sublimierte, indem sich an das untere Ende der Capillare feine, mehrere Millimeter lange weiße, glasklare Krystalle ansetzten, die ich dann mittels der Farbenreaktionen als Morphin identifizieren konnte. Von den für Morphin ausgeprobten Reaktionen wandte ich ausschließlich Fröhdes Reagens (5 mg Molybdänsäure oder Natriummolybdat werden in 1 ccm heißer konzentrierter Schwefelsäure gelöst) und Marquis' Reagens an. (2 bis 5 Tropfen Formaldehydum solutum — formalum — werden vor dem Gebrauche mit 3 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure gemischt.) Bei diesen Reaktionen kann man nach Autenrieth[1]) auf die Anwesenheit von Morphin schließen, wenn bei Anwendung von Fröhdes Reagens sich die zu untersuchende Substanz zunächst mit schön violetter Farbe löst, die dann durch Blau in ein schmutziges Grün und schließlich in ein schwarzes Rot übergeht. Auf Zusatz von Wasser müssen diese Färbungen verschwinden. Bei Anwendung des Marquisschen Reagens löst sich Morphin mit purpurroter Farbe auf, die dann violett und schließlich rein blau wird.

Ehe ich nun zur Beschreibung der Rauchopiumversuche am Kaninchen übergehe, scheint es mir zweckmäßig zu sein, das charakteristische Wirkungsbild des Morphins auf das Atemzentrum des Warmblüters auf Grund eigener Vorversuche in kurzen Zügen ins Gedächtnis zu rufen.

---

[1]) Autenrieth, Auffindung der Gifte, S. 114 und 280.

Es ist schon lange bekannt, daß das Morphin in ganz spezifisch elektiver Weise die Erregbarkeit des Atemzentrums herabsetzt, noch ehe irgendwelche andere betäubende Wirkungen sich einstellen. Die Erregbarkeit des Atemzentrums zu messen, vermögen wir, wie A. Loewy[2]) zuerst gezeigt hat, dadurch, daß wir der einzuatmenden Luft bestimmte Mengen von CO_2 beimengen. Dabei hat sich gezeigt, daß mit wechselnden Mengen von CO_2, die der Inspirationsluft beigemengt werden, nicht bloß der CO_2-Gehalt der exspirierten Luft entsprechend ansteigt, sondern daß auch die Atmungsgröße, d. i. das Volumen der in der Zeiteinheit eingeatmeten Luft wesentlich vergrößert wird, ohne daß dabei die Atemfrequenz erheblich ansteigt.

Versuchsanordnung.

Das Versuchstier (Kaninchen) wurde tracheotomiert und die in die Trachea eingeführte Glaskanüle mit sog. Lippenventilen verbunden, die so eingerichtet waren, daß die Inspirations- und Exspirationsluft voneinander getrennt waren. Das Ventil, durch das die Exspirationsluft hindurchtrat, wurde mit einer Gasuhr in Verbindung gebracht. Außerdem war eine Verbindung zwischen der Trachea und einem Schreibhebel hergestellt, der durch eine passende Anordnung die Atemzüge des Tieres auf einem Kymographion registrieren konnte.

Es wurde zunächst das Atemvolumen und die Atemfrequenz eines derartig behandelten Kaninchens unter normalen Verhältnissen, d. h. bei Einatmung freier Zimmerluft festgestellt. Hierauf wurde das Inspirationsventil mit einem Gummisacke, der mit 5 bzw. 10% CO_2-haltiger Luft angefüllt war, in Verbindung gebracht und nun die durch die vermehrte CO_2-Zufuhr veränderte Atemgröße bestimmt.

Dabei ergaben sich folgende Durchschnittswerte:

Zeit	Durchschnittl. Atemvolumen pro Minute			Atemfrequenz pro Minute		
	bei Zimmerluft ccm	bei 5% CO_2 ccm	bei 10% CO_2 ccm	bei Zimmerluft	bei 5% CO_2	bei 10% CO_2
sofort . . .	850	950	1000	120 bis 140		—
nach 5 Min.	—	1400	1700	—	—	—

[2]) A. Loewy, Zur Kenntnis der Erregbarkeit des Atemzentrums. Arch. f. d. ges. Physiol. 47, 601, 1890.

Ergebnis:

Steigerung des Atemvolumens

bei 5% CO_2 . . . . 55%
bei 10% CO_2 . . . . 80%

Nun wurde die Vena jugularis auf der einen Seite frei präpariert und in dieselbe eine verschließbare Kanüle eingeführt. Durch diese Kanüle wurde nun dem Kaninchen ein bestimmtes Quantum Morphin zugeführt und nun die sich daraus ergebenden Veränderungen in der Atmung festgestellt.

Wirkung des Morphins auf die Atmung beim Kaninchen.

In den beiden folgenden Tabellen sind die Versuchsergebnisse wiedergegeben bei Injektion von 5 bzw. 10 mg Morphin.

Kaninchen: 1550 g.

	Normales Atemvolum	Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . .	750	84
bei 5% CO_2	920	82

Dosis: 5 mg Morphin um 10^{40}.

Tabelle I.

Zeit	Atemvolumen pro Minute		Atemfrequenz pro Minute	
	bei Zimmerluft ccm	bei 5% CO_2 ccm	bei Zimmerluft	bei 5% CO_2
10^{45}	610	780	71	68
11^{00}	580	680	61	60
11^{30}	580	670	61	62
12^{00}	600	720	61	60
12^{30}	620	760	60	59
1^{00}	660	800	65	68
1^{30}	670	820	70	72
2^{00}	670	810	69	71

Kaninchen: 1800 g.

	Normales Atemvolumen	Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . .	1200	110
bei 5% CO_2	1680	112

Dosis: 10 mg Morphin um 10^{00}.

Tabelle II.

Zeit	Atemvolumen pro Minute		Atemfrequenz pro Minute	
	bei Zimmerluft ccm	bei 5% CO_2 ccm	bei Zimmerluft	bei 5% CO_2
10^{05}	980	1200	55	52
10^{30}	700	840	48	47
11^{00}	690	780	42	45
12^{00}	700	790	50	51
1^{00}	800	890	48	48
2^{00}	880	950	48	48
3^{00}	920	970	55	59

Diese Versuchsergebnisse lassen sich leicht graphisch darstellen, wenn man auf der Abszisse die Zeiten, auf der Ordinate die Atemvolumina aufträgt.

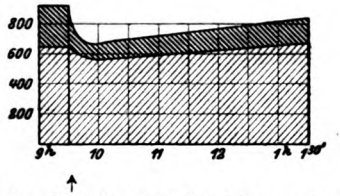


Fig. 1. Veränderung der Erregbarkeit des Atemzentrums beim Kaninchen durch intravenöse Injektion von 5 mg Morph. hydrochl.

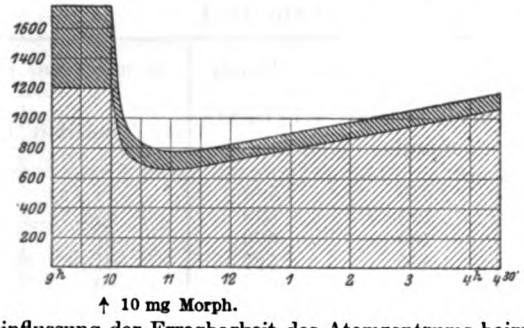


Fig. 2. Beeinflussung der Erregbarkeit des Atemzentrums beim Kaninchen durch intravenöse Injektion von 10 mg Morph. hydrochl.

Atemvol. bei Zimmerluft.
„ „ 5% CO_2-haltiger Luft.

Aus den beiden Fig. 1 und 2 ist außerdem noch ersichtlich, daß die frühere Erregbarkeit des Atemzentrums auch bei mehrstündiger Ausdehnung des Versuches sich nicht mehr einstellt.

II. Versuchsanordnung zur Einleitung von Rauchopiumdämpfen in die Lungen des Kaninchens.

In ein Verbrennungsrohr, wie man solches in der organischen Chemie zu Elementaranalysen verwendet, wurde ein kleines Porzellanschiffchen mit dem zu verrauchenden Rauchopium eingeführt. Dieses Rauchopium[1]) (Tschandu) wurde vor dem Versuche durch mehrere Stunden bei einer Temperatur von 90 bis 100° getrocknet. Das eine Ende des Verbrennungsrohres wurde mit dem einen Schenkel einer in die Trachea des Kaninchens eingeführten T-förmigen Glaskanüle, der andere Schenkel dieser Kanüle mit einem T-förmigen Glasröhrchen verbunden. Von diesem letzteren Röhrchen war das eine Ende mit einer kleinen Saugpumpe (Inhalt ca. 100 ccm) verbunden, während an dem anderen Ende dieses Röhrchens ein kleiner Schlauch mit einer Absperrvorrichtung angebracht war. Endlich war an dem anderen Ende des Verbrennungsrohres ein Gummischlauch mit Ballon angebracht.

Der Vorgang war nun folgender:

Das Schiffchen im Verbrennungsrohre wurde bis zum Beginn einer Rauchbildung erhitzt, dann wurde mit der Saugpumpe ungefähr auf 50 ccm angesogen, dabei die Verbindung zwischen Trachea und Verbrennungsrohr gesperrt; nun wurde diese alsbald geöffnet, die Verbindung zur Pumpe gesperrt und nun die im Verbrennungsrohre befindlichen Rauchgase mit Hilfe des Gummiballons in die Lunge des Kaninchens hineingepreßt; dieser Vorgang konnte dann beliebig oft wiederholt werden. Vor und nach den einzelnen Rauchversuchen wurden die Atemvolumina und die Atemfrequenz gemessen.

In den folgenden drei Tabellen sind die Versuchsergebnisse nach drei Rauchversuchen wiedergegeben.

Versuch vom 3. Juli.

Kaninchen: 1630 g.

	Normales Atemvolumen	Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . .	950	79
bei 5% CO_2 . . .	1400	78

Um 10^{50} Beginn des Rauchens. Dauer ca. 10 Minuten.

[1]) Das Rauchopium wurde uns von der Holländischen Regie in Batavia in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Ebenso verdanke ich ein Quantum siamesischen Tschandu aus Bangkok der freundlichen Vermittlung des Herrn Prof. G. Boehm in Freiburg i. Br.

Tabelle III.

Zeit	Atemvolumen pro Minute		Atemfrequenz pro Minute	
	bei Zimmerluft ccm	bei 5% CO_2 ccm	bei Zimmerluft	bei 5% CO_2
12^{00}	700	810	80	78
12^{30}	840	1050	75	73
12^{50}	900	1150	71	70
1^{00}	650	750	80	79
1^{10}	590	700	78	77
1^{15}	600	720	80	79

Ergebnis des ersten Rauchens:

Maximale Abnahme des Gesamtvolumens
bei Zimmerluft . . . 15%
bei 5% CO_2 . . . . 25%
Atemfrequenz ziemlich unverändert.

Ergebnis des zweiten Rauchens:

Normale Abnahme des Gesamtvolumens
bei Zimmerluft . . . 27%
bei 5% CO_2 . . . . 50%

Versuch vom 7. Juli.

Kaninchen: 1500 g.

	Normales Atemvolumen	Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . .	700	87
bei 5% CO_2 . . .	890	89

Tabelle IV.

Zeit	Normales Atemvolumen pro Minute		Atemfrequenz pro Minute		Bemerkungen
	bei Zimmerluft ccm	bei 5% CO_2 ccm	bei Zimmerluft	bei 5% CO_2	
10^{15}	—	—	—	—	Beginn des ersten Rauchens. Dauer 10 Min.
10^{30}	500	630	70	73	
10^{35}	480	610	73	72	
10^{40}	490	630	73	73	
10^{45}	—	—	—	—	Beginn des zweiten Rauchens. Dauer 10 Min.
11^{00}	460	600	64	68	
11^{10}	440	580	64	67	
11^{20}	480	590	67	69	
11^{25}	—	—	—	—	Beginn des dritten Rauchens. Dauer 10 Min.
11^{40}	430	560	64	68	
11^{45}	410	530	63	67	
11^{50}	410	530	63	67	
12^{00}	460	580	65	69	

Ergebnis des ersten Rauchversuches:

Maximale Abnahme des Gesamtvolumens
bei Zimmerluft . . . 31%
bei 5% CO_2 . . . . 32%

Maximale Abnahme der Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . . 19%
bei 5% CO_2 . . . . 19%

Ergebnis des zweiten Rauchversuches:

Maximale Abnahme des Gesamtvolumens
bei Zimmerluft . . . 38%
bei 5% CO_2 . . . . 35%

Maximale Abnahme der Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . . 26%
bei 5% CO_2 . . . . 26%

Ergebnis des dritten Rauchversuches:

Maximale Abnahme des Gesamtvolumens
bei Zimmerluft . . . 45%
bei 5% CO_2 . . . . 40%

Maximale Abnahme der Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . . 27%
bei 5% CO_2 . . . . 27%

Versuch vom 11. Juli.

Kaninchen: 1570 g.

	Normales Atemvolumen	Normale Atemfrequenz
bei Zimmerluft . .	740	130
bei 5% CO_2 . . .	1130	135

Tabelle V.

Zeit	Normales Atemvolumen pro Minute		Atemfrequenz pro Minute		Bemerkungen
	bei Zimmerluft ccm	bei 5% CO_2 ccm	bei Zimmerluft	bei 5% CO_2	
9^{50}	—	—	—	—	Beginn des ersten Rauchens. Dauer 10 Min.
10^{00}	680	950	125	124	
10^{10}	650	920	120	122	
10^{20}	650	930	120	123	
10^{30}	—	—	—	—	Beginn des zweiten Rauchens. Dauer 10 Min.
10^{40}	610	890	118	115	
10^{50}	600	870	112	110	
11^{00}	590	870	105	107	
11^{05}	—	—	—	—	Beginn des dritten Rauchens. Dauer 10 Min.
11^{20}	560	800	99	97	
11^{30}	550	790	96	99	
11^{40}	550	780	95	98	

Ergebnis des ersten Rauchversuches:

Maximale Abnahme des Gesamtvolumens
bei Zimmerluft . . . 12%
bei 5% CO_2 . . . . 18%

Maximale Abnahme der Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . . 4%
bei 5% CO_2 . . . . 9%

Ergebnis des zweiten Rauchversuches:

Maximale Abnahme des Gesamtvolumens
bei Zimmerluft . . . 20%
bei 5% CO_2 . . . . 23%

Maximale Abnahme der Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . . 10%
bei 5% CO_2 . . . . 12%

Ergebnis des dritten Rauchversuches:

Maximale Abnahme des Gesamtvolumens
bei Zimmerluft . . . 26%
bei 5% CO_2 . . . . 30%

Maximale Abnahme der Atemfrequenz
bei Zimmerluft . . . 25%
bei 5% CO_2 . . . . 23%

Von derartigen Versuchen wurden nun eine Reihe von Wiederholungen angestellt und dabei mit großer Regelmäßigkeit dieselben Resultate erzielt, nämlich eine auf das Rauchen hin prompt einsetzende erhebliche Herabsetzung der Erregbarkeit des Atemzentrums bei fast immer eintretender Verminderung der Atemfrequenz, also eine spezifische Morphinwirkung.

III. Biologischer Nachweis des Morphins an weißen Mäusen nach der Straubschen Methode.

Die Straubsche Methode besteht darin, daß man Mäusen die auf Morphin zu untersuchende Substanz unter die Rückenhaut einspritzt. Bei Gegenwart von Morphin beobachtet man nach 2 bis 40 Minuten eine eigentümliche Stellung des Schwanzes. Es gerät nämlich der Schwanz der Mäuse in eine katatonische Starre, die sich darin äußert, daß sich der Schwanz bogenförmig über den Rücken emporkrümmt, bei maximal ausfallenden Re-

aktionen sich fast parallel zu der Wirbelsäule legt; diese Reaktion hält je nach der Größe der Dosis bis zu vielen Stunden an. Die geringste Menge Morphin, die diese Reaktion noch aufzuweisen vermag, beträgt nach den Untersuchungen von O. Herrmann[1]) 0,01 mg; das Optimum liegt bei 0,1 mg. Die Reaktion ist, wie bereits früher erwähnt, spezifisch für Morphin und tritt mit anderen Alkaloiden nicht ein.

Diese neue Methode wendete ich nun in der Weise an, daß ich zunächst nach der beschriebenen Versuchsanordnung Kaninchen wiederholt den Opiumrauch inhalieren ließ und nach jedem einzelnen Rauchversuche dem Tiere aus der freigelegten Carotis Blutproben entnahm. Von den auf diese Weise gewonnenen Blutproben wurde die eine Hälfte in kleinen Krystallisierschälchen im Eisschranke bis zum nächsten Tage aufgehoben und das Serum von diesen Blutproben in verschiedenen Mengen (niemals mehr als $1^1/_2$ ccm) den Mäusen injiziert. Von der anderen Hälfte der Blutproben wurden alkoholische Extrakte in folgender Weise hergestellt: Die Blutproben wurden mit einem Gemisch von 25 ccm absolutem Alkohol und 5 ccm Weinsäure durch längere Zeit kräftig durchgeschüttelt, hierauf filtriert und das Filtrat bis zur Trockne über dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand wurde mit 2 bis 3 ccm angesäuertem Wasser aufgenommen, filtriert und das Filtrat kurz vor den Injektionsversuchen mit doppeltkohlensaurem Natron abgestumpft.

Von den vielen auf diese Weise ausgeführten Versuchen sei folgender in Kürze mitgeteilt:

Rauchversuch vom 17. November 1911.

Beginn des Rauchens	4^{10}
Erste Blutentnahme (Serum I, Alkoholextrakt I)	4^{17}
Erste Wiederholung des Rauchens	4^{21}
Zweite Blutentnahme (Serum II, Alkoholextrakt II)	4^{25}
Zweite Wiederholung des Rauchens	4^{30}
Dritte Blutentnahme (Serum III, Alkoholextrakt III)	4^{35}
Dritte Wiederholung des Rauchens	4^{40}
Vierte Blutentnahme (Serum IV)	4^{45}

[1]) O. Herrmann, diese Zeitschr. 40, 1912.

Versuche an der Maus.

Tabelle VI.

Injektionsmenge: 1 ccm.

Zeit	Blutprobe	Beginn der Reaktion nach	Beginn der max. Reakt. nach	Dauer der Reaktion	Dauer der maximalen Reaktion
9^{25}	Serum I	30′	—	1h 10′	—
9^{26}	„ II	21′	35′	1h 30′	37′
9^{27}	„ III	25′	38′	2h	40′
9^{28}	„ IV	30′	40′	2h 20′	—
11^{00}	Blutextr. I	20′	—	50′	—
	„ II	20′	—	1h	—
	„ III	15′	30′	1h 40′	50′

Aber noch auf eine andere Weise war es möglich, mit Hilfe dieser neuen biologischen Methode den Nachweis zu erbringen, daß im Opiumrauche sich wenigstens ein großer Teil des im Rauchopium enthaltenen Morphins unzersetzt vorfindet.

Es wurde wieder ein Porzellanschiffchen mit vorher gut getrocknetem Rauchopium beschickt und in einem Verbrennungsrohre bis zum Auftreten von Rauchentwicklung erhitzt. Die sich dabei bildenden Dämpfe wurden in zwei Kaliapparaten, die mit 50%iger Essigsäure angefüllt waren, aufgefangen. Die Essigsäure nahm sehr bald eine gelbliche, später rötlich-braune Färbung an.

Der Inhalt der Kaliapparate wurde in einem Porzellanschälchen über dem Wasserbade bis zur Trockne eingedampft. Der teerartige Rückstand wurde mit 7 ccm Wasser aufgenommen, erhitzt und filtriert; das Filtrat war gelblich gefärbt, klar und reagierte schwach sauer. Mit dieser Lösung wurde nun eine Reihe von Versuchen an der Maus angestellt.

In Tabelle VII sind diese Versuche übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle VII.

Zeit	Injizierte Menge ccm	Beginn der Reaktion nach	Beginn der maximalen Reaktion nach	Dauer der Reaktion	Dauer der maximal. Reaktion	Entspricht Morphinmengen mg
3^{15}	0,5	25′	35′	$2^1/_2$h	1h	0,03—0,08
3^{30}	0,25	10′	25′	2h	1h	0,03—0,08
3^{45}	0,2	10′	15′	$2^1/_2$h	1h	0,03—0,08
4^{11}	0,1	10′	19′	$1^1/_2$h	$^1/_2$h	0,01—0,02
4^{20}	0,05	—	—	—	—	—

Die übrige Menge der Lösung, ca. 3 ccm, wurde einem Kaninchen intravenös injiziert. Es ergab sich dabei eine deutliche, wenn auch nicht lange anhaltende Beeinflussung der Atmung im Sinne einer reinen Morphinwirkung (Verminderung des Atemvolumens, Herabsetzung der Regulation auf CO_2-Reize).

Zusammengefaßt würden die Ergebnisse vorstehender Untersuchungen und Beobachtungen dahin lauten:

1. Es wurde gezeigt, daß Morphin auch im nicht luftverdünnten Raume sublimierbar ist, also im Opiumrauch enthalten sein kann.

2. Es wurde mit Sicherheit nachgewiesen, daß die Wirkung des Rauchopiums auf die Gegenwart unzersetzten Morphins im Opiumrauche zurückzuführen ist

a) durch die charakteristische Beeinflussung des Atemzentrums beim Kaninchen,

b) durch die Straubsche Morphinreaktion an der Maus.

Zur Frage des Abbaues von Mononatriumurat unter dem Einfluß von Radiumemanation bzw. Radium D.

Von

Johannes Kerb und Paul Lazarus[1]).

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

(Eingegangen am 1. Mai 1912.)

Die meisten bisher beobachteten biochemischen Wirkungen des Radiums lassen sich auf eine Beeinflussung enzymatischer Prozesse zurückführen.

Spezifische Radiumwirkungen rein chemischer Art sind noch nicht festgestellt worden, sondern es konnte sogar, wie Caspari und Neuberg[2]) an einem größeren Beobachtungsmaterial zeigten, die völlige chemische Unwirksamkeit des Radiums, seiner Emanation sowie seiner Zerfallsprodukte gegenüber zahlreichen Substanzen bei den bisher üblichen Konzentrationsverhältnissen dargetan werden.

Caspari und Neuberg hatten die Unempfindlichkeit von vielen einfachen Substanzen und von Körpern der Kohlenhydrat-, Fett- sowie Eiweißgruppe gegen Radium und seine Umwandlungsprodukte erkannt. Eine angebliche Sonderstellung der Purinreihe war daher höchst auffallend und von vornherein wenig wahrscheinlich.

Den einzigen Fall einer typisch chemischen Wirkung von Radiumabkömmlingen stellte nach Gudzents[3]) Angaben der Abbau des Mononatriumurats unter dem Einflusse von

---

[1]) Mitgeteilt in der Sitzung der Berliner medizinischen Gesellschaft vom 14. Februar 1912.

[2]) W. Caspari und C. Neuberg, Berl. klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 11, S. 521.

[3]) F. Gudzent, Verhdl. d. deutsch. Kongresses für innere Med., Wiesbaden **1910**, S. 539; Zeitschr. f. klin. Med. **71**, Heft 3—6.

Emanation bzw. ihres Umwandlungsproduktes Radium D dar; nur dieses, nicht aber die von der Emanation selbst und ihren anderen Zerfallsprodukten (Radium A, B, C) ausgehenden α-, β-, γ-Strahlen sollte die Zerstörung der Harnsäure bewirken. Gudzent teilte mit, daß beim Schütteln von Mononatriumurat in Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung bei Gegenwart von Radiumemanation bzw. Radium D der Stickstoffgehalt der filtrierten Lösung alsbald zunehme. Dagegen behauptet Gudzent, daß bei bloßem Schütteln mit reinem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung der Stickstoffgehalt des Filtrates auch nach Wochen keinen Anstieg zeige.

Gudzent glaubte daher in dem Radium D eine Substanz gefunden zu haben, die spezifisch das Mononatriumurat in löslichere Verbindungen (die Lactim- in die Lactamform) verwandele, ja sogar bis zu Ammoniak und Kohlensäure abbaue. Gudzent stützte auf diese Angaben die Radiumtherapie der Gicht.

Bei dem hohen wissenschaftlichen wie praktischen Interesse, das diese Frage bietet, schien uns eine Nachprüfung von Gudzents Versuchen dringend notwendig.

Wir befolgten die Versuchsanordnung von Gudzent. Er bringt die beständige Form des Mononatriumurats in einer großen Pulverflasche mit dem Lösungsmittel (Wasser oder physiologische Kochsalzlösung) in Berührung und sorgt durch Rühren für eine gute Durchmischung. Die Pulverflasche wird im Thermostaten bei 37° gehalten. Nach bestimmten Zeiten wird aus der Flasche durch eine Hebervorrichtung ein Teil des Inhaltes entnommen und nach Filtration auf den N-Gehalt nach Kjeldahl untersucht. Wir zogen es vor, das zu untersuchende Mononatriumurat in Menge von je 0,5 g mit 250 ccm Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung in einzelnen Flaschen mit Glasstopfen im Thermostaten bei 37° zu schütteln, statt wie Gudzent eine größere Menge Mononatriumurat in einem einzigen größeren Gefäß zu rühren. Vom chemischen oder physikalischen Standpunkte aus bieten natürlich die beiden Methoden keinerlei Unterschiede. Im übrigen schien uns unsere Arbeitsweise, bei der zu jeder Stickstoffbestimmung nach einer bestimmten Zeit der Inhalt einer ganzen Flasche filtriert wurde, eher noch exakter als die Gudzentsche, auf alle Fälle steriler.

Wir haben ferner in allen Fällen neben den Versuchen mit Radium D Kontrollversuche unter sonst gleichen Bedingungen, aber ohne radiumhaltige Substanzen angestellt.

Die Radium-D-Lösung gewannen wir genau wie Gudzent durch Eindampfen einer 8 Tage im Emanator mit Emanation gesättigten Wassermenge von 2 l auf etwa 1 l. Die ursprüngliche Lösung wies 5000 Mache-Einheiten (= ca. 500 000 sog. Volt) pro Liter auf. Die eingebrachte Lösung blieb sodann 2 Tage stehen, wobei Radium A, B und C praktisch verschwinden und nur Radium D übrigbleibt.

Bei den Versuchen mit physiologischer NaCl-Lösung wurde in dem Radium-D-Wasser die entsprechende Quantität Kochsalz gelöst. Bei einigen Versuchen verwendeten wir auch direkt ein Radium D-haltiges Präparat, s. S. 89. (Bei den Versuchen, wo Sterilität angestrebt wurde, ist die Lösung durch nochmaliges Siedenlassen vor dem Gebrauche in üblicher Weise keimfrei gemacht.)

Unsere Resultate waren folgende:

1. Bei peinlich genauem Einhalten absolut gleicher Versuchsbedingungen zeigen die Versuche mit Radiumemanation oder Radium D keine irgendwie wesentlichen Unterschiede gegenüber den Kontrollversuchen ohne Radiumsubstanzen.

2. Die Größe der Zunahme des Stickstoffgehaltes der Filtrate ist abhängig von der Art der Versuchsbedingungen, insbesondere von mehr oder weniger sterilem Arbeiten. Bei absolutem Ausschlusse von Luftkeimen und bei völlig indifferentem Gefäßmaterial (Glas) findet auch in Gegenwart größerer Mengen von Radium D keine Zerlegung des harnsauren Natriums statt.

3. Unter dem Einflusse von Schimmelpilzen und Bakterien tritt schon in kurzer Zeit eine sehr bedeutende Zunahme des Stickstoffgehaltes im Filtrate, bzw. ein Abbau des harnsauren Natriums bis zum Ammoniak ein.

Das Mononatriumurat ist also ein Körper, der in Wasser suspendiert unter dem Einfluß von Bakterien bzw. Schimmelpilzen zerfällt und nur bei Einhalten absoluter Sterilität und bei Benutzung völlig alkalifreier Gläser sich nicht verändert.

Von der freien Harnsäure war dieses Verhalten schon seit langer Zeit bekannt. St. Bierema[1]) hat den Abbau der Harnsäure zu NH_3 durch Penicillum glaucum beobachtet.

Für das Monokaliumurat haben Kreidl[2]) und neuerdings Kossowicz[3]) den Zerfall durch zahlreiche ubiquitäre Bakterien festgestellt. Es war daher von vornherein sehr unwahrscheinlich, daß das Mononatriumsalz, gewissermaßen der Zwillingsbruder des Monokaliumsalzes, ein abweichendes Verhalten zeigen sollte.

Gudzents Resultate betreffs des Abbaues von Mononatriumurat sind wohl so zu erklären, daß bei seiner Versuchsanordnung keine Sterilität herrschte und infolgedessen eine ständige Zersetzung des Mononatriumurats stattfand.

Weiterhin war an folgende Fehlerquellen zu denken: 1. Sekundäre Oxydation durch Ozonentwicklung, 2. Zersetzung des Mononatriumurats durch Alkaliabgabe aus den angewandten Glasgefäßen und 3. an eine Zerstörung des harnsauren Salzes durch Licht.

1. Eine Ozonwirkung ist ohne weiteres bei den Versuchen mit dem fast strahlenlosen Radium D auszuschließen. Eine erhebliche Ozonisierung des Luftsauerstoffs ist bisher nur bei α-strahlenden Substanzen, aber nicht beim Radium D, beobachtet worden, das nur schwache und spärliche β-Strahlen aussendet.

2. Sehr ernstlich ist die Frage der Harnsäurezerstörung durch Alkaliabgabe zu diskutieren. Kreidl (l. c.) hat überzeugend nachgewiesen, daß sich eine Lösung von Monokaliumurat durch bloßes Kochen erheblich zersetzt. His und Paul[4]), auf deren Feststellungen sich Gudzent sonst vielfach beruft, haben ausdrücklich angegeben, daß die Harnsäure beim Aufbewahren ihrer wässerigen Lösung in Glasgefäßen beim einfachen Stehen zum Teil gespalten wird. In Fortführung dieser Untersuchung beobachtete Gudzent[5]) selbst: „alle Salze der Harnsäure, am leichtesten das Ammoniumurat, zersetzen sich beim Erwärmen über 60°.... Auch unterhalb 60° bei längerer Erwärmung

[1]) Bierema, Centrabl. f. Bakt. II. Abt. **23**, 709, 1909.
[2]) Kreidl, Monatsh. f. Chem. **14**, 110, 1893.
[3]) A. Kossowicz, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie **1**, 60, 1912.
[4]) W. His und Th. Paul, Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 1, 1900.
[5]) F. Gudzent, Zeitschr. f. physiol. Chem. **56**, 176, 1908.

und selbst bei Zimmertemperatur innerhalb einiger Monate tritt die Zersetzung ebenfalls auf". Vorausgesetzt, daß diese Beobachtungen Gudzents richtig sind, so sind in seinen Radiumversuchen die gleichen Bedingungen für die Zerlegung des harnsauren Natriums gegeben, und es ist schwer verständlich, wieso seine im Brutschrank gehaltenen Kontrollen nach 6 Tagen völlig unverändert sind.

Wir haben demzufolge einen Teil unserer Versuche in mehrfach und jedesmal frisch ausgedämpften Gläsern vorgenommen und fanden, daß dann keine Zersetzung der Mononatriumuratlösung stattfand, solange die Sterilität gewahrt blieb.

Wir wollen bei dieser Gelegenheit erwähnen, daß wir auch festes Mononatriumurat in einwandsfreien Gläsern ohne jede Zersetzung Monate lang aufbewahren konnten, wenn Licht, Luft und Feuchtigkeit gänzlich ferngehalten wurden.

3. Einer möglichen Zersetzung der Harnsäure durch Licht haben wir dadurch vorgebeugt, daß wir die Digestion und Schüttelung in einem lichtdichten Metallkasten vorgenommen haben.

Diese Vorsicht ist notwendig, da Neuberg[1]) früher gezeigt hat, daß Harnsäure bei Gegenwart von Spuren von Metallsalzen ausgesprochen photosensibel ist und in 2 Tagen bis zu 40% zerstört werden kann. Daß Gudzent diese Fehlerquelle ausgeschlossen hat, ist aus seinen Angaben nicht zu entnehmen.

Wenn Gudzent bei seinen Kontrollversuchen ohne Radium D keine Zunahme der Löslichkeit des harnsauren Natriums gefunden haben will, so können seine Versuchsbedingungen unmöglich die gleichen gewesen sein, wie bei den Versuchen mit Radium D.

Besonders unerklärlich sind Gudzents Angaben, daß er in keinem einzigen seiner Kontrollversuche eine Bildung löslicher Zersetzungsprodukte des Mononatriumurats gefunden habe, einerlei ob es sich um Wasserkontrollen oder um Kontrollversuche mit einem α-Strahler (Polonium) oder um solche mit β- und γ-strahlendem Material (Radiumsalz in zugeschmolzenen Glasröhrchen) handelte.

Genau die gleichen Einwände wie gegen Gudzents Resultate müssen zunächst gegen die Schlußfolgerungen von P. Meser-

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 29, 290, 1910.

nitzky[1]) erhoben werden. Derselbe behauptet in einer inzwischen erschienenen Arbeit, daß ein Abbau des Mononatriumurats durch α-Strahlen erfolge, die von einem überaus starken Radiumpräparat (5 Millicurie) ausgesendet wurden.

Bei den bestimmten Versicherungen Gudzents, daß er die α-Strahlung in zahlreichen durch Kontrollen gesicherten Versuchen als völlig wirkungslos befunden habe, besteht zwischen beiden Behauptungen ein unlösbarer Widerspruch. Er klärt sich dadurch auf, daß Mesernitzky offenbar die gleichen Versuchsfehler wie Gudzent unterlaufen sind.

Bei Beurteilung der Zuverlässigkeit der Angaben Mesernitzkys ist seine Behauptung in Betracht zu ziehen, „L'addition de l'eau oxygenée ne produisit aussi aucun effet"; er gibt also an, daß H_2O_2 keine Einwirkung auf harnsaures Natrium habe, während Scholz (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**, 4130, 1901) sowie Schittenhelm und Wiener (Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**, 100, 1909) Umwandlung in die leicht löslichen N-haltigen Stoffe Tetracarbonimid und Carbonyldiharnstoff durch Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Natriumurat außer Zweifel gestellt haben.

Nachdem die Resultate unserer Untersuchungen in den Sitzungen d. Berl. med. Ges. vom 14. Februar 1912 und 6. März 1912[2]) mitgeteilt worden waren, erschien im Aprilheft der Zeitschr. f. physiol. Chem. eine Arbeit von E. v. Knaffl-Lenz und Wilhelm Wiechowski[3]), welche die von uns festgestellte absolute Unwirksamkeit der Radiumzerfallsprodukte, insbesondere auch des Radiums D, auf den Abbau des Mononatriumurats vollauf bestätigten. Übrigens haben diese Autoren mit einem noch stärkeren Radiumpräparat als Mesernitzky gearbeitet und trotzdem ihre negativen Ergebnisse erzielt.

Auszug aus den Versuchsprotokollen.

Wir geben aus jeder Gruppe der verschiedenen angestellten Versuchsreihen je eine Serie wieder.

Das überall verwendete Mononatriumurat war unter den üblichen Kautelen bereitet, krystallisiert und analysenrein. Zu

---

[1]) P. Mesernitzky, Compt. rend. **154**, 770, 1912; Le Radium **9**, 145, 1912.

[2]) Siehe Berl. klin. Wochenschr. Nr. 12 und Nr. 14, sowie Med. Klinik vom 24. Februar 1912.

[3]) E. von Knaffl-Lenz und W. Wiechowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**, 303, 1912.

den ersten orientierenden Versuchen wurde Leitungswasser verwendet.

Das Emanationswasser wurde nach Gudzents Angaben 2 Stunden ausgekocht und 48 Stunden an der Luft stehen gelassen. Das Wasser zum Kontrollversuch wurde in gleicher Weise behandelt.

Von den jeweils erhaltenen 1000 ccm wurden 4 Stöpselflaschen zu je 250 ccm gefüllt und 0,5 bis 1,0 g Mononatriumurat zugegeben. Hier wie in allen übrigen Fällen wurde zu der in den Tabellen angegebenen Zeit der Inhalt je einer Flasche filtriert. Von dem erhaltenen Filtrate dienten 2mal 100 ccm zu einer Doppelbestimmung des Stickstoffs.

I.

Std.	Ra D mg N pro 100 ccm	Kontrolle mg N pro 100 ccm
2	15,9	15,9
24	36,6 [1])	20,7
48	26,4	20,4
96	18,6	16,5

II.

Std.	Ra D mg N pro 100 ccm	Kontrolle mg N pro 100 ccm
2,5	23,04	21,0
24	39,6	31,5
48	33,0	45,6
72	38,4	42,9

In den Versuchen I und II sind prinzipielle Unterschiede zwischen den RaD-haltigen und radiumfreien Lösungen nicht zu erkennen. Bezüglich der absoluten Größe der N-Werte sei daran erinnert, daß in der später benutzten physiologischen NaCl-Lösung die Löslichkeit des Mononatriumurats 10mal geringer ist.

Zu den folgenden Versuchen wurde physiologische Kochsalzlösung aus destilliertem Wasser und reinstem NaCl „Kahlbaum“ benutzt.

Dabei wurde ein von Herrn Dr. Gudzent freundlichst zur Verfügung gestelltes Präparat (2) mit unserem Mononatriumurat (1) verglichen.

---

[1]) Innerhalb der ersten 24 Stunden fand eine Störung in der Heizung des Thermostaten statt.

III.

Std.	Präparat 1 mg N pro 100 ccm	Präparat 2 mg N pro 100 ccm
4	2,7	2,7
72	4,6	4,5

Die Präparate zeigten also in ihren Löslichkeitsverhältnissen ausreichende Übereinstimmung.

Für den folgenden Versuch wurde emanationshaltiges destilliertes Wasser ausgekocht, 2 Tage stehen gelassen und dann mit der nötigen Menge NaCl versetzt. Das Wasser zum Kontrollversuch wurde in gleicher Weise behandelt.

IV.

Std.	Ra D mg N pro 100 ccm	Kontrolle mg N pro 100 ccm
1	2,7	2,7
22	6,9	6,9
48	5,3	5,7
72	5,1	4,5

Zu den nächsten Versuchen verwendeten wir ein stark radium-D-haltiges Präparat, das Herr Dr. Plesch von Dr. Szilard aus dem Institut Curie erhalten und uns freundlichst überlassen hatte.

1 mg dieses Präparats entsprach nach Szilard der aus einer 1000000 ME starken Emanation gewonnenen Radium-D-Menge.

Der eine Versuch (a) wurde mit reiner physiologischer Kochsalzlösung aus frisch destilliertem Wasser angestellt. Bei dem Parallelversuch (b) wurde die Kochsalzlösung vorher gekocht und bei fast 100° in die bereits Natriumurat und Radium D enthaltende Flasche gefüllt. Aus diesem Umstande erklärt sich der hohe Stickstoffwert der Anfangsbestimmung. Der Rückgang des N-Wertes nach längerer Abkühlung beweist aber, daß es sich hierbei keineswegs um eine fortschreitende Zersetzung handelt.

V.

Radium D (0,6 mg).

Std.	a) mg N pro 100 ccm	b) (steril) mg N pro 100 ccm
4	2,1	9,0[1])
48	3,9	4,3

[1]) Lösung kochend eingefüllt.

Als weitere Versuche seien folgende angeführt:

a) 50 mg des obenerwähnten Radium-D-Präparats wurden in physiologischer Kochsalzlösung mit Mononatriumurat (0,5 g) 72 Stunden lang geschüttelt.

b) Eine ebenso bereitete Suspension von Mononatriumurat in physiologischer Kochsalzlösung wurde statt mit Radium D mit Schimmelsporen (Penicillium glaucum) versetzt uud gleichfalls 72 Stunden geschüttelt.

Die Füllung der Flasche a) geschah unter Einhaltung aller Regeln absoluter Asepsis.

VI.

	a) Radium-D-Präparat 50 mg = 50 000 000 ME; steril	b) Zusatz von Schimmelsporen
Std.	mg N pro 100 ccm	mg N pro 100 ccm
2	2,7	2,8
72	2,7	38,6
	im Filtrat kein Ammoniak nachweisbar.	im Filtrat starke Reaktion auf Ammoniak.

VII.

Der folgende Versuch wurde mit aus Emanation nach Gudzent bereitetem Radium D und mit Fäulnisbakterien angesetzt. Zur Verwendung kam die Suspension von 0,5 g Mononatriumurat in ausgekochtem und mit 0,89% NaCl versetztem Emanationswasser. Die Bakterien wurden einer nach E. Salkowski angesetzten, 24 Stunden alten Fäulnismischung entnommen. Die Einsaat in die Mononatriumuratsuspension geschah mit einer Normal-Platinöse; die übertragene Menge war also verschwindend.

	a) Ra D aus Emanation = 5000 ME sterilisiert	b) Zusatz von Fäulnisbakterien
Std.	mg N pro 100 ccm	g N pro 100 ccm
2	2,7	2,8
72	2,9	36,0

Quantitative Bestimmung der Milchsäure neben β-Oxybuttersäure.

Von

Julius Mondschein.

(Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors Dr. O. v. Fürth im physiologischen Institute der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 12. Mai 1912.)

Mit 2 Figuren im Text.

Einleitung.

Die große biologische Bedeutung der Milchsäure und der β-Oxybuttersäure hat zahlreiche Versuche zur quantitativen Bestimmung derselben gezeitigt, die durch die Arbeiten von v. Fürth und Charnaß[1]) einerseits, von Schaffer[2]) andererseits insofern zu einem gewissen Abschlusse gelangt sind, als die nunmehr vorliegenden Methoden die quantitative Bestimmung dieser Säuren, zumindestens in reinen wässerigen Lösungen derselben, mit ausreichender Sicherheit gestatten[3]).

Die quantitative Bestimmung der Milchsäure nach v. Fürth und Charnaß beruht auf dem zuerst von Boas angewandten Prinzipe, daß die Milchsäure, bei Oxydation unter geeigneten Versuchsbedingungen, quantitativ zu Acetaldehyd, Kohlensäure und Wasser nach der Gleichung:

$$\begin{array}{l}\mathrm{CH_3}\\ |\\ \mathrm{CHOH}\\ |\\ \mathrm{COOH}\end{array} + \mathrm{O} = \begin{array}{l}\mathrm{CH_3}\\ |\\ \mathrm{CHO}\end{array} + \mathrm{CO_2} + \mathrm{H_2O}$$

zerfällt.

[1]) Diese Zeitschr. **26**, 1908.

[2]) Journ. of biol. Chemistry **5**, 1908.

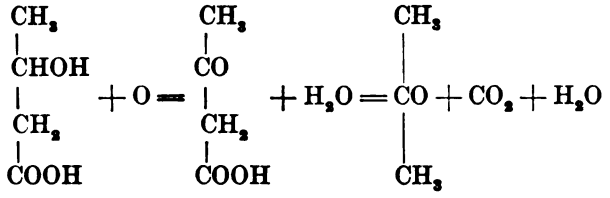
[3]) Literatur über Bestimmung der Milchsäure siehe bei C. Neuberg in Neuberg, Der Harn, S. 252 bis 254, und der β-Oxybuttersäure ebendas. S. 260 bis 265.

Der Vorgang ist derart, daß die milchsäurehaltige Flüssigkeit in 1%iger schwefelsaurer Lösung in einem Kolben zum Sieden erhitzt und tropfenweise mit $^n/_{10}$ Kaliumpermanganat versetzt wird.

Der entstehende Acetaldehyd wird unter guter Kühlung überdestilliert, unter Vermeiden von Verlusten in einer Vorlage in Wasser aufgefangen und nach Rippers[1]) Vorgange mit Bisulfit und Jod titrimetrisch bestimmt.

Die Methode gibt bei Anwendung von entsprechender Korrektur eine annähernd quantitative Ausbeute.

Zur Bestimmung der β-Oxybuttersäure geht man nach Schaffers Vorgange derart vor, daß man die β-oxybuttersäurehaltige Flüssigkeit in 5%iger schwefelsaurer Lösung zum Sieden erhitzt und tropfenweise mit Kaliumbichromatlösung versetzt; dabei zerfällt die β-Oxybuttersäure nach der Gleichung:



über Acetessigsäure in Aceton, Kohlensäure und Wasser.

Das überdestillierte Aceton wird in Wasser aufgefangen und nach Messinger[2])[3])[4]) maßanalytisch mit Jod und Thiosulfat bestimmt.

Da die β-Oxybuttersäure und die Milchsäure in tierischen Flüssigkeiten und Organen nebeneinander auftreten können, die gleichzeitige genaue Bestimmung derselben jedoch, da beide Methoden interferieren, nicht ohne weiteres möglich ist, bin ich, einer Aufforderung des Herrn Professors v. Fürth folgend, darangegangen, ein Verfahren auszuarbeiten, das die gleichzeitige, exakte Bestimmung der beiden Säuren in einem Gemische derselben ermöglicht.

---

[1]) Ripper, Eine allgemein anwendbare maßanalyt. Bestimmung d. Aldehyde. Monatsh. f. Chem. 21.

[2]) Messinger, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 1888.

[3]) Collischon, Zeitschr. f. anal. Chem. 29.

[4]) Geelmuyden, Zeitschr. f. anal. Chem. 35.

1. Versuche zur Anwendung des Milchsäurebestimmungsverfahrens auf β-Oxybuttersäure und umgekehrt.

Ich habe damit begonnen, festzustellen, ob es nicht bei Anwendung des Oxydationsverfahrens mit Kaliumbichromat nach Schaffer etwa möglich sei, eine quantitative Abspaltung von Aldehyd aus Milchsäure zu erzielen.

Zu diesem Behufe wurden Milchsäuremengen, deren Gehalt auf alkalimetrischem Wege genau festgestellt worden war, dem Schafferschen Verfahren unterworfen:

1. Versuch.

20 ccm Milchsäure = 0,2682 g Milchsäure;
5%ige schwefelsaure Lösung 400 ccm
oxydiert mit 0,5%iger Lösung von $K_2Cr_2O_7$;
der abgespaltene Aldehyd bestimmt nach Ripper:

$$\text{Ausbeute} = \frac{21{,}4\,\%}{\text{der zugesetzten Menge.}}$$

2. Versuch.

Dieselben Versuchsbedingungen, nur eine 1%ige schwefelsaure Lösung.

$$\text{Ausbeute} = 11{,}1\,\%.$$

Es ergab sich sonach, daß die Aldehydabspaltung unter den gewählten Versuchsbedingungen höchst unvollkommen und nichts weniger als quantitativ sich vollzieht.

Es ergab sich ferner eine Bestätigung der bereits von Jerusalem[1]) festgestellten Tatsache, daß die β-Oxybuttersäure Oxydationsmitteln gegenüber weit resistenter ist als die Milchsäure, und daß unter Bedingungen, unter denen eine quantitative Acetonabspaltung sich vollzieht, der Aldehyd einer weiteren Oxydation anheimfällt.

Ich legte mir nun weiter die Frage vor, ob es nicht andererseits etwa möglich sei, aus β-Oxybuttersäure unter den von v. Fürth und Charnaß gewählten Versuchsbedingungen durch Oxydation mit Permanganat eine quantitative Acetonabspaltung zu erzielen.

Es wurde eine Reihe von Versuchen mit variierenden Schwefelsäurekonzentrationen ausgeführt und die abdestillierte

[1]) E. Jerusalem, diese Zeitschr. **12**, 1908.

Acetonmenge nach Messingers Verfahren titrimetrisch ermittelt.

Verwendete β-Oxybuttersäuremenge		Wasser	Schwefelsäurekonzentration	Gefundene β-Oxybuttersäuremenge	
ccm	g	ccm	%	g	% des geford. Wertes
20	0,2288	300	0,5	0,0224	9,8
20	0,2288	300	1,0	0,0234	10,2
20	0,2288	300	2,0	0,0192	8,4
20	0,2288	300	3,0	0,0156	6,8
20	0,2288	300	4,0	0,0125	5,4
20	0,2288	300	5,0	0,0106	4,6

Es ergab sich aus den mitgeteilten Versuchen, daß von einer quantitativen Acetonabspaltung unter diesen Bedingungen keine Rede sein kann, insofern meist weniger als 10% der theoretischen Ausbeute an Aceton gefunden worden sind.

Es ergab sich daraus weiterhin die Folgerung, daß eine Bestimmung beider Säuren nebeneinander in einer Operation nicht möglich ist.

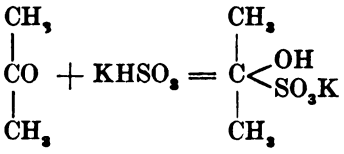
Wenn wir in einem Gemenge beider Säuren Milchsäure mit Permanganat oxydieren, wird sich im Destillate dem Aldehyd aber stets Aceton beimengen; andererseits aber wird, wenn wir in einem derartigen Gemenge die β-Oxybuttersäure nach Schaffer bestimmen, sich dem abdestillierenden Aceton auch stets Aldehyd beimengen.

Wenn wir daher in einem Gemenge beider Säuren diese exakt ermitteln wollen, stehen wir vor dem Probleme, Aldehyd neben Aceton auf titrimetrischem Wege zu ermitteln.

2. Titrimetrische Bestimmung von Aceton und Aldehyd nebeneinander.

Da nach den Erfahrungen von v. Fürth und Charnaß zur titrimetrischen Bestimmung des Aldehyds das Rippersche Verfahren, das auf der Addition von schwefliger Säure an die Aldehydgruppe beruht, dem auf Jodoformbildung basierenden Messingerschen Verfahren ganz außerordentlich überlegen ist, stellte ich mir zunächst die Frage, ob es nicht etwa möglich sei, auch das Aceton nach Rippers Verfahren exakt zu bestimmen.

Wissen wir ja doch, daß Ketone ebenso wie Aldehyde befähigt sind, schweflige Säure zu addieren, z. B.:



Nun beruht das Rippersche Verfahren darauf, daß eine Lösung von Kaliumbisulfit von jodometrisch ermitteltem Gehalte zu der zu prüfenden Aldehydlösung hinzugefügt wird.

Bereits nach kurzdauerndem Stehen bei Zimmertemperatur ist die Addition eine quantitative und kann aus der verschwundenen Menge schwefliger Säure durch Zurücktitrieren mit Jod die Aldehydmenge mit großer Genauigkeit ermittelt werden.

Man konnte also von vornherein erwarten, daß ein gleicher Vorgang sich auch für das Aceton anwendbar erweisen würde.

Ich habe daher eine Reihe von Acetonlösungen (reinstes Aceton von Kahlbaum, aus der Bisulfitverbindung, spezifisches Gew. 0,802 bei 15°, Siedepunkt 56,5°), deren Gehalt überdies nach Messinger kontrolliert war (gefundene Ausbeute 99,08%), dem Ripperschen Verfahren unterworfen:

Angewandte Acetonmenge		Gefundene Acetonmenge	
ccm	g	g	% des geford. Wertes
2	0,0211	0,0075	35,5
2	0,0211	0,0073	34,6
2	0,0211	0,0046	21,8
5	0,0527	0,0062	11,7
5	0,0527	0,0036	6,8

Wie aus vorstehenden Versuchen ersichtlich ist, erscheint also das Rippersche Verfahren für die Acetonbestimmung nicht anwendbar.

Eine weitere Versuchsreihe, bei der dieselbe Acetonmenge unter variierender Verdünnung zur Anwendung gelangte, ergab, daß die unter allen Umständen sehr schlechten Titrationsresultate sich mit zunehmender Verdünnung noch sehr wesentlich verschlechterten:

Angewandte Acetonmenge		Wasserverdünnung	Gefundene Acetonmenge	
ccm	g	ccm	g	% des geford. Wertes
5	0,0527	20	0,0126	23,9
5	0,0527	50	0,0107	20,3
5	0,0527	100	0,0084	15,9
5	0,0527	200	0,0056	10,6
5	0,0527	300	0,0039	7,4
5	0,0527	400	0,0026	4,9

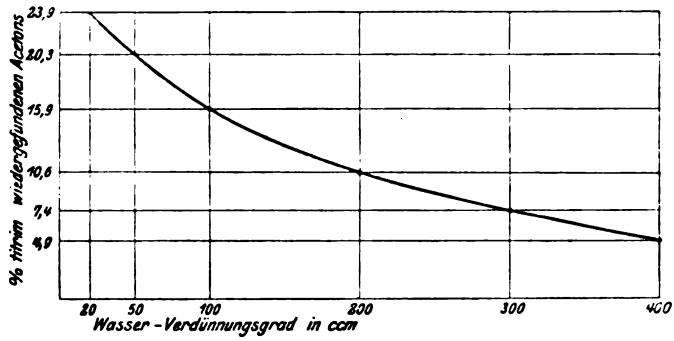


Fig. 1.

Dieses auffällige und angesichts der außerordentlichen Exaktheit des Ripperschen Verfahrens unerwartete Resultat findet seine einfache Erklärung in dem Umstande, daß, wenn ein Molekül Aceton mit einem Molekül schwefliger Säure versetzt wird, allerdings Addition erfolgt; gleichzeitig aber spielt sich ein Vorgang hydrolytischer Dissoziation ab, derart, daß neben der gebundenen schwefligen Säure stets ein Bruchteil derselben in freier Form vorhanden ist, wobei sich der Einfluß eines Überschusses von schwefliger Säure bzw. des Verdünnungsgrades in bekannter Weise manifestieren wird.

Wird daher der Überschuß an ungebundener schwefliger Säure bei der Jodtitration beseitigt, so wird sogleich sich ein neues Gleichgewicht einstellen und ein neuer Anteil schwefliger Säure in Freiheit gesetzt[1]).

So kommt es also, namentlich bei Anwendung höherer Verdünnungsgrade, daß sich praktisch nur ein sehr geringer

[1]) W. Kerp, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 21, Heft 2, 1904.

Bruchteil der vorgelegten schwefligen Säure an Aceton gebunden findet.

Die Dissoziationsverhältnisse, die theoretisch auch selbstverständlich beim Aldehyd eine Rolle spielen sollten, kommen praktisch hier nicht in Betracht, da offenbar die Bindungsfestigkeit der schwefligen Säure an den Aldehyd außerordentlich stärker ist.

Immerhin aber kann man bei Einhaltung ganz bestimmter Versuchsbedingungen beim Aceton konstante Bindungsverhältverhältnisse erwarten; ich betone das ausdrücklich, da ich von dieser Tatsache bei Ausarbeitung meines Bestimmungsverfahrens Gebrauch gemacht habe.

Es ergab sich nunmehr die Frage, wie man es anstellen könne, um Aldehyd und Aceton quantitativ zu trennen.

Einen Fingerzeig bot mir eine Angabe Schaffers, der bei einer β-Oxybuttersäurebestimmung im Harn störende, insbesondere aus Glucose stammende, flüchtige jodbindende Substanzen in der Weise zu beseitigen vermochte, daß er sein Destillat einer neuerlichen Destillation bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd und Lauge unterwarf und die störenden Substanzen auf diese Weise wegbrachte.

Ich versuchte also zunächst, ob es möglich sei, Acetaldehyd durch Destillation mit Wasserstoffsuperoxyd und Lauge unter den von Schaffer angegebenen Versuchsbedingungen quantitativ zu zerstören.

Versuch.

10 ccm Aldehyd = 0,0493 g
(Kontrollbestimmung nach Ripper ergab 98,2%)
mit 300 ccm H_2O, 10 ccm 12%ig. H_2O_2 und 10 ccm NaOH (10%ig) destilliert; in der Vorlage den Aldehyd nach Ripper bestimmt: 0,041 g.
Ausbeute = 83,2%.

Es war sonach die Zerstörung des Aldehyds in dieser Weise nicht nur nicht gelungen, vielmehr der weitaus größte Teil desselben der Zerstörung entgangen.

Dieser Mißerfolg war offenbar darin begründet, daß der außerordentlich flüchtige Aldehyd destilliert, ehe noch die oxydative Wirkung eingesetzt hat.

Ich ging daher weiterhin derart vor, daß ich das Gemenge von Aldehyd unter Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd und Lauge

25 Minuten lang am Rückflußkühler erhitzte und dann erst der Destillation unterwarf.

Versuch.

Ich habe zunächst den Titer eines Gemenges von Aldehyd und Aceton für die Rippersche Bestimmung ermittelt, sodann die Aldehydzerstörung vorgenommen und festgestellt, wieviel von dem Titerwerte auf Rechnung des intakt gebliebenen Acetons gekommen war.

5 ccm Aldehyd = 0,02465 g; 5 ccm Aceton = 0,0527 g in 300 ccm H_2O;

(Aldehyd + Aceton) entspricht bei Titration nach Ripper 12,2 ccm $^n/_{10}$-Jod,

hierauf Aldehyd zerstört [Erhitzen mit 300 ccm H_2O + 10 ccm H_2O_2 (12%ig) + 10 ccm NaOH (10%ig)] und destilliert.

Aceton (wieder nach Ripper in derselben Verdünnung wie oben, also 300 ccm) entspricht 1,3 ccm $^n/_{10}$-Jod;

Aldehyd entspricht also 12,2 — 1,3 = 10,9 ccm $^n/_{10}$-Jod,

1 ccm $^n/_{10}$-Jod = $^1/_2$ ccm $^n/_{10}$-Aldehyd = 0,0022 g Aldehyd.

$$\text{Ausbeute} = \frac{(10{,}9 \times 0{,}0022) \times 100}{0{,}02465} = 97{,}4\%.$$

Vier weitere, analoge Versuche ergaben Aldehydmengen von 0,024 (97,4%), 0,0245 (99,4%), 0,0238 (96,5%), 0,024 (97,4%).

Es hatte sich so gezeigt, daß bei diesem Vorgange 97 bis 99%, also praktisch die Gesamtmenge des Aldehyds zerstört wird, während, wie bereits Schaffer gefunden hat, Aceton dabei intakt bleibt.

Will man also das Aceton in so einem Gemenge bestimmen, so verfährt man folgendermaßen:

Das Gemisch von Aldehyd und Aceton wird der Oxydation mit Lauge und Wasserstoffsuperoxyd unterworfen, um nach dem Überdestillieren des intakt gebliebenen Acetons dasselbe nach Messinger zu bestimmen[1]).

3. Methode der gleichzeitigen Bestimmung der Milchsäure neben β-Oxybuttersäure.

Auf Grund des so gewonnenen Einblickes konnte ich nunmehr daran gehen, ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung der Milchsäure neben β-Oxybuttersäure auszuarbeiten.

---

[1]) Literatur über Oxydation von Aldehyden: Blank und Finkenbeiner, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**. — Geo W. Heimrod und P. Lavene, Rockefeller Inst. New York. Diese Zeitschr. **29**, 1910.

Prinzip der Methode.

Das Prinzip dieses Verfahrens ist folgendes: Die Milchsäure und die β-Oxybuttersäure werden in getrennten Portionen des zu untersuchenden Gemenges für sich bestimmt.

Um zunächst die Milchsäure zu bestimmen, wird dieselbe, dem Vorgange von v. Fürth und Charnaß folgend, in 1%iger schwefelsaurer Lösung durch Zutropfen von Permanganat bei Siedehitze vorsichtig oxydiert.

Dabei erhält man die gesamte, aus der Milchsäure stammende Aldehydmenge, der sich eine gewisse Menge Aceton (aus der β-Oxybuttersäure stammend) beimengt.

Das so gewonnene Destillat, 400 ccm, wird halbiert; in der einen Hälfte wird das Bindungsvermögen für schweflige Säure nach Ripper titrimetrisch ermittelt; die zweite Hälfte wird durch Kochen am Rückflußkühler mit Wasserstoffsuperoxyd und Lauge vom Aldehyd befreit.

Hierauf wird neuerlich destilliert und das Destillat auf 200 ccm gebracht und nunmehr durch Titration (also unter genau denselben Verdünnungsverhältnissen wie bei der ersten Bestimmung) nach Ripper ermittelt, wieviel von dem Titerwerte nicht auf Rechnung des Aldehyds, vielmehr auf Rechnung des beigemengten Acetons gekommen war.

Eine einfache Subtraktion belehrt uns sodann über die vorliegende Aldehydmenge, sonach die in der Probe vorhandene Milchsäure.

Ein anderer Teil des zu untersuchenden Gemisches von Milchsäure und β-Oxybuttersäure wird nunmehr nach dem Vorgange von Schaffer mit 0,5%iger Kaliumbichromatlösung in 4%iger schwefelsaurer Lösung oxydiert.

Diesmal enthält das Destillat die Gesamtmenge des aus der β-Oxybuttersäure stammenden Acetons, dem sich etwas von der Milchsäure herrührenden Aldehyd beimengt; es wird nunmehr am Rückflußkühler, wie vorher, mit Wasserstoffsuperoxyd und Lauge behandelt, so vollständig von Aldehyd befreit und neuerlich destilliert.

Das im zweiten Destillat enthaltene, nunmehr von Verunreinigungen befreite Aceton wird nach dem Verfahren von Messinger titrimetrisch ermittelt und auf β-Oxybuttersäure umgerechnet.

Ausführung der Methode.

Bei der Zusammenstellung des Apparates habe ich die von v. Fürth und Charnaß angegebene Anordnung im allgemeinen beibehalten, insbesondere haben sich mir die von Charnaß eingeführten halbkugelförmigen Glasschliffe sehr gut bewährt, insofern dieselben die Beweglichkeit der Teile des Apparates erheblich steigern, die Zerbrechlichkeit dementsprechend herabmindern.

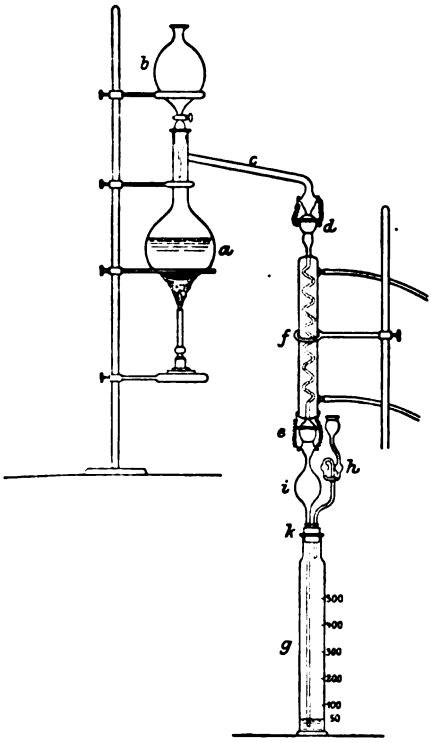


Fig. 2.

Es sei jedoch bemerkt, daß bei Mangel an entsprechender Laboratoriumseinrichtung der Apparat durch einen viel einfacheren ersetzt werden kann, bei dem Kautschukverbindungen die Glasschliffe vertreten, ohne daß hierbei die Bestimmung wesentlich beeinflußt wird.

Ich habe dem Kühler statt einer schrägen eine vertikale Stellung gegeben, da ich so die Gefahr des Zurücksteigens der Flüssigkeit aus der Vorlage in den Destillationskolben vermeiden wollte.

Die Versuchsanordnung ist aus beistehender Zeichnung (Fig. 2) ersichtlich.

Die zu untersuchende Lösung kommt in den ca. $^3/_4$ l fassenden Kolben *a*, der einen mittels eines Glasschliffes eingefaßten Tropftrichter *b* von 500 ccm Inhalt trägt; durch das Ansatzrohr *c* ist der Kolben mit einem Schlangenkühler *f* verbunden, die Vorlage bildet ein 500 ccm fassender Meßzylinder *g*, der einen doppelt durchbohrten Gummistopfen *k* trägt; die eine Bohrung ist für den Vorstoß *i* bestimmt; die zweite trägt einen Wasserverschluß des Systems ermöglichenden Kugeltrichter *h*.

Um ein leichteres Herausnehmen des Kugeltrichters zu ermöglichen, wird derselbe besser nicht direkt in den Gummistopfen, sondern in eine eingepaßte, mit Glasschliff versehene Glasröhre eingefügt.

Nach der Beendigung des Versuches kann der Gummistopfen durch einen eingeschliffenen Glasstopfen ersetzt werden.

Die Ausführung der Bestimmung gestaltet sich nunmehr folgendermaßen:

Dieselbe ist davon abhängig, ob man in einer Milchsäure-β-Oxybuttersäuremischung

a) nur die Milchsäure,
b) nur die β-Oxybuttersäure, oder
c) beide quantitativ bestimmen will.

a) Will man in der Mischung nur die Milchsäure bestimmen, so verfährt man folgendermaßen: Der Kolben *a* wird mit 300 ccm 1%iger Schwefelsäure, einigen Bimssteinstücken und mit der zu analysierenden Milchsäure-β-Oxybuttersäurelösung beschickt. Die Menge soll 0,4 g jeder Säure nicht überschreiten.

Der Tropftrichter *b* wird mit einer $^n/_{10}$-Kaliumpermanganatlösung durch Ansaugen (mit Hilfe eines in die obere Öffnung eingepaßten Gummischlauches) von unten her gefüllt.

Sodann wird der Tropftrichter in den leicht eingefetteten Glasschliff eingesetzt.

In den Meßzylinder *g* kommen 50 ccm Wasser, hierauf wird der Gummistopfen eingesetzt, der Kugeltrichter *h* bis zur Hälfte mit Wasser gefüllt, die Spiralfedern, die den Schluß der Kugelgelenke *d* und *e* gewährleisten, eingesetzt und mit der Kühlung begonnen.

Die Flüssigkeit im Kolben *a* wird mit Hilfe eines Drahtnetzes vorsichtig zum Kochen gebracht, die Luft verdrängt, was man daran erkennt, daß die Vorlageflüssigkeit zurückzusteigen beginnt; sodann wird mit der Oxydation begonnen.

Das Oxydationsmittel wird tropfenweise zugesetzt und zwar so, daß die Flüssigkeit jedesmal entfärbt ist, ehe der nächste Tropfen zufließt.

Der Zufluß soll etwa gleichen Schritt mit der überdestillierenden Flüssigkeit halten.

Werden die einfallenden Tropfen nicht mehr entfärbt, so läßt man noch ca. 10 ccm Permanganat nachfließen (die Flüssigkeit erscheint braun, infolge Braunsteinabscheidung) und setzt die Destillation fort, bis eine Flüssigkeitsprobe bei dem eröffneten Kugelgelenke *e* entnommen mit Jod und Lauge keine Jodoformtrübung mehr gibt.

In der Regel genügt das Abdestillieren von 50 ccm nach dem Einfallen des letzten nicht mehr entfärbten Tropfens.

Man trennt jetzt die Verbindung zwischen dem Kühler und dem Vorstoß, spült die Flüssigkeit vom Kugeltrichter in den Zylinder, nimmt den Gummistopfen heraus, füllt auf 400 ccm auf, verschließt mit dem eingeschliffenen Glasstöpsel und mischt gut durch.

Das so gewonnene Destillat wird halbiert; 200 ccm werden herauspipettiert, die anderen 200 ccm werden in dem Zylinder nach Ripper behandelt, also mit einem Überschuß einer gemessenen Menge von $^n/_{10}$-Kaliumbisulfitlösung versetzt, gut geschüttelt und bei Zimmertemperatur $^1/_4$ Stunde stehen gelassen.

Diese Zeit wird benutzt, um den Titer der angewandten Bisulfitlösung zu stellen (der von einem Versuch zum anderen sich merklich ändert).

Schließlich wird der Überschuß des Bisulfits unter Zusatz einer Stärkelösung mit $^n/_{10}$-Jodlösung bis zu beginnender Blaufärbung titriert.

Aus dieser Titration erhalten wir eine Jodmenge (natürlich multipliziert mit 2, für die ganze Bestimmung), die dem Aldehyd $+ \frac{1}{x}$ Aceton entspricht.

Die anderen 200 ccm kommen in einen $^3/_4$ l fassenden Kolben, werden auf 300 ccm verdünnt und mit 10 ccm einer 12%igen Wasserstoffsuperoxydlösung und 10 ccm Natronlauge (10%) versetzt; einige zugesetzte Bimssteinstücke verhindern das Stoßen.

Der Stopfen ist einfach durchbohrt und trägt einen Liebigschen Kühler.

Die Flüssigkeit wird mit Hilfe eines Drahtnetzes zum Sieden erhitzt und bei guter Kühlung 25 Minuten im mäßigen Sieden erhalten; hierauf wird vollständig abkühlen gelassen, der Kühler durchgespült und die Flüssigkeit wieder in den Kolben *a* (Fig. 2) gebracht. Der eingeschliffene Tropftrichter wird durch einen eingeschliffenen Glasstöpsel ersetzt, hierauf wird genau wie früher destilliert bis etwa 150 ccm übergegangen sind, auf 200 ccm aufgefüllt (früheres Flüssigkeitsquantum) und die nunmehr vom Aldehyd befreite Flüssigkeit, also $\frac{1}{x}$ Aceton, genau so wie vorher nach Ripper titriert.

Die erhaltene Jodmenge (wieder mit 2 multipliziert) wird von der vorher erhaltenen subtrahiert, also die Differenz der ersten und zweiten Bestimmung gibt den Aldehyd:

$$\underset{\text{erste Bestimmung}}{(\text{Aldehyd} + \tfrac{1}{x}\ \text{Aceton})} - \underset{\text{zweite Bestimmung}}{\tfrac{1}{x}\ \text{Aceton}} = \text{Aldehyd}.$$

1 ccm $^n/_{10}$-Jod entspricht $^1/_2$ ccm $^n/_{10}$-Aldehyd, demnach $^1/_2$ ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,0045 g.

Bei Berücksichtigung der von v. Fürth und Charnaß eingeführten Korrektur entspricht 1 ccm $^n/_{10}$-Jod = 0,005 g Milchsäure.

b) Will man die β-Oxybuttersäure in dem Gemisch quantitativ bestimmen, so verfährt man folgendermaßen:

Der Kolben *a*, Fig. 2, wird mit der Milchsäure-β-Oxybuttersäuremischung und 400 ccm einer 4%igen Schwefelsäure beschickt; einige Bimssteinstücke fördern den richtigen Gang der Destillation.

Die Kugel *b* wird mit 500 ccm einer 0,5%igen Kaliumbichromatlösung gefüllt und die Destillation genau so wie sub a) geleitet; man destilliert 400 ccm ab, das abdestillierte Wasser muß durch die Kaliumbichromatlösung ersetzt werden.

Schließlich wird auf 600 ccm ausgefüllt, ein aliquoter Teil, am bequemsten die Hälfte davon, also 300 ccm werden herauspipettiert, in einen $^3/_4$ l fassenden Kolben übertragen und genau so behandelt wie sub a), also mit 10 ccm einer 12%igen Wasserstoffsuperoxydlösung und 10 ccm Natronlauge.

Hierauf wird nochmals destilliert und im Destillate (200 ccm genügen) das nunmehr allein vorhandene Aceton nach Messinger bestimmt.

1 ccm $^n/_{10}$-Jod entspricht 0,000967 g Aceton, entspricht 0,001734 g β-Oxybuttersäure.

c) Handelt es sich nur um ein Gemisch der beiden Säuren, ohne daß andere sauer oder basisch reagierende Stoffe vorhanden sind, so kann man durch direkte Titration, auf alkalimetrischem Wege, die Summe ermitteln und dann die Milchsäure nach Vorgang a) bestimmen, aus der Differenz die β-Oxybuttersäure rechnen.

Man kann eventuell auch die optische Aktivität zur Bestimmung heranziehen.

Bei kleinen Mengen β-Oxybuttersäure ist die polarimetrische Bestimmung unzulässig.

Da aber z. B. bei schweren Fällen von Diabetes bis zu 30 g β-Oxybuttersäure täglich im Harn ausgeschieden werden, so kann man unter Umständen diesen Weg einschlagen. Die β-Oxybuttersäure dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links[1]); von den drei bekannten Modifikationen der Äthylidenmilchsäure ist im Harn wesentlich die d-Milchsäure vorhanden.

(Die freie d-Milchsäure dreht schwach rechts und ihre Salze drehen schwach links.)

Hat man also ein Gemisch von β-Oxybuttersäure (große Menge) und inaktiver Milchsäure vor sich, so kann man die Milchsäure nach Vorgang a), die β-Oxybuttersäure auf polarimetrischem Wege bestimmen.

Dreht die Milchsäure auch die Ebene des polarisierten Lichtes, so muß man von der Linksdrehung der β-Oxybuttersäure die Rechtsdrehung der Milchsäure, nach der Bestimmung der letzteren auf oxydativem Wege berechnet, in Abzug bringen.

4. Beleganalysen.

Als Material für die Analysen benutzte ich ein Gemenge von Milchsäure- und β-Oxybuttersäurelösungen (reinstes Präparat Kahlbaum).

Um Verluste bei der Wägung zu umgehen, habe ich eine wässerige Lösung der beiden Säuren benützt, deren Gehalt auf alkalimetrischem Wege festgestellt worden war.

Ich teile eine Reihe von Bestimmungen in Milchsäure-β-Oxybuttersäuremischungen in tabellarischer Form mit, die mit bekannten Mengen ausgeführt worden sind.

---

[1]) v. Mering und Minkowski, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **26**, 1890. — A. Deichmüller, F. Szymanski und B. Pollens, Annal. d. Chem. **1885**, 208. — Embden und Schmitz, Abderhaldens Handb. d. bioch. Arbeitsmethoden **3**, 1910. — A. Magnus-Levy, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **45**, 1901. — P. Bergell, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 1901. — O. F. Black, Journ. of biolog. Chemistry **5**, 1908. — E. Darmstädter, Zeitschr. f. phys. Chem. **37**, 1903.

Vorgelegte Milchsäuremenge		Vorgelegte β-Oxybuttersäuremenge		Gefundene Milchsäure		Gefundene β-Oxybuttersäure	
ccm	g	ccm	g	g	% des geforderten Wertes	g	% des geforderten Wertes
20	0,2781	10	0,1144	0,2759	99,2	0,1122	98,0
20	0,2781	10	0,1539	0,2732	98,2	0,1535	99,7
10	0,139	20	0,3078	0,1401	100,7	0,2996	97,3
20	0,2781	20	0,2288	0,275	98,8	0,2202	96,2
				Mittel	99,2	—	97,8

Wie aus vorstehender Tabelle zu ersehen ist, wurde von der angewandten Milchsäure im Mittel 99,2%, von der β-Oxybuttersäure im Mittel 97,8% wiedergefunden.

Die Ausbeute ist eine so befriedigende, daß das Problem der Bestimmung der Milchsäure und der β-Oxybuttersäure in einer wässerigen Lösung, die ein Gemenge dieser beiden Substanzen enthält, als gelöst betrachtet werden kann.

5. Zusammenfassung.

Die Bestimmung von Milchsäure und von β-Oxybuttersäure in Lösungen, die beide Substanzen nebeneinander enthalten, kann in getrennten Portionen derselben, nach dem Verfahren von v. Fürth und Charnaß (Oxydation mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung) einerseits, von Schaffer (Oxydation mit Bichromat in schwefelsaurer Lösung) andererseits erfolgen.

Da aber in beiden Fällen ein Gemenge von Aldehyd und Aceton destilliert, ist eine Trennung dieser beiden Substanzen erforderlich.

Bei der Milchsäurebestimmung wird eine Korrektur in der Weise eingeführt, daß in einem aliquoten Teile des Destillates der Aldehyd durch Kochen mit Wasserstoffsuperoxyd und Lauge zerstört, worauf das Aceton neuerlich überdestilliert und unter denselben Bedingungen wie früher nach Ripper titriert wird.

Bei der β-Oxybuttersäurebestimmung wird das Aceton und Aldehyd enthaltende Destillat durch Kochen mit Wasserstoffsuperoxyd und Lauge vom Aldehyd befreit, das Aceton neuerlich überdestilliert und nach Messinger titrimetrisch bestimmt.

Über die quantitative Bestimmung von Milchsäure bei Gegenwart von Eiweißkörpern.

Von

Julius Mondschein.

(Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors Dr. O. v. Fürth im physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 12. Mai 1912.)

Mit 2 Figuren im Text.

Bekanntlich bildet die Milchsäure einen wichtigen Bestandteil tierischer Organe, und die in Organextrakten nachweisbaren Mengen dieser Substanz enstammen zum Teil vitalen, zum größeren Teil jedoch postmortalen Prozessen.

Da die quantitative Bestimmung der Milchsäure eine Vorbedingung für die exakte Behandlung zahlreicher biologischer Probleme bildet, hat mich Herr Prof. v. Fürth mit der Aufgabe betraut, festzustellen, in welcher Art das von ihm gemeinsam mit Charnaß ausgearbeitete Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure in wässerigen Lösungen für eiweißhaltige Flüssigkeiten, bzw. für die eiweißhaltigen kolloidalen Systeme, wie es Organe sind, in zweckmäßiger Weise abgeändert werden kann.

Bekanntlich sind die Eiweißkörper amphotere Substanzen, die vermöge der in ihnen enthaltenen Komplexe vom Typus $R\langle^{NH_2}_{COOH}$ sowohl Säuren als Basen zu binden vermögen und durch die Einwirkung solcher in Acidalbumine bzw. Alkalialbuminate[1]) umgewandelt werden.

---

[1]) Literatur über Acidalbumine bzw. Alkalialbuminate: F. Goldschmidt, Säuren und Eiweiß. Diss. Straßburg 1898. — E. Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 1899. — J. E. Johansson, Zeitschr. f.

Will man daher die Milchsäure z. B. im Muskelgewebe bestimmen, so liegt es auf der Hand, daß ein Teil der Milchsäure, die durch einen Vorgang unbekannter Art in freiem Zustande innerhalb des Organes entsteht, zu den Eiweißkörpern in Beziehung treten wird.

Man hat bisher auf die Möglichkeit des Auftretens von Milchsäure-Eiweißverbindungen bei der Bestimmung dieser Säure in keiner Weise Rücksicht genommen, sich vielmehr damit begnügt, die Organe mit siedendem Wasser zu erschöpfen und die Säure im Filtrate zu bestimmen; dabei ist es durchaus nicht von vornherein selbstverständlich, daß die an Eiweiß gebundene Milchsäure durch den Koagulationsvorgang in Freiheit gesetzt wird und quantitativ im Filtrate erscheint.

Um ein rationelles Verfahren für die Milchsäurebestimmung in Organen auszuarbeiten, mußte daher zunächst die Vorfrage gelöst werden, wie man vorgehen muß, um die Milchsäure in eiweißhaltigen Lösungen exakt zu bestimmen.

1. Milchsäurebestimmung in serumalbuminhaltigen Lösungen.

Ich ging zunächst derart vor, daß ich mir durch eine Versuchsreihe darüber Klarheit zu verschaffen suchte, ob und inwieweit die Milchsäure in einer serumalbuminhaltigen Lösung in einem praktisch in Betracht kommenden Maße gebunden wird.

Zu diesem Zwecke wurde eine Menge von reinem Serumalbumin (Merckscher Präparat) in Wasser gelöst und so eine Lösung von bekanntem Gehalte mit bekannten Milchsäuremengen versetzt, die Lösung sodann auskoaguliert, das Koagulum durch Auskochen mit Wasser erschöpft und die im

---

physiol. Chem. **9**, 1885. — W. Kühne, Protoplasma und Kontraktilität. Leipzig 1864. — O. v. Fürth, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **36**, 1895. — W. Erb, Zeitschr. f. Biol. **41**, 1901. — B. Robertson, Journ. of Biolog. Chem. **2**, 1907. — O. Maas, Zeitschr. f. physikal. Chem. **30**, 1900. — O. Zoth, Sitzungsber. d. Wien. Akad., math.-naturw. Kl., Abt. III, **100**, 1891. — Dieudonné, Verh. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg. Münch. med. Wochenschr. **1903**, S. 43. — J. Sjöquist, Skand. Arch. f. Physiol. **5**, 1894; **6**, 1895. — O. Cohnheim, Zeitschr. f. Biol. **33**, 1896. — O. Cohnheim und M. Krieger, Zeitschr. f. Biol. **40**, 1900. — St. Bugarszky und Liebermann, Arch. f. d. ges. Physiol. **72**, 1898. — K. Spiro und Pemsel, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 1898. — A. Danilewsky, Zeitschr. f. physiol. Chem. **5**, 1881.

Filtrate nachweisbare Milchsäuremenge unter Anwendung von Phenolphthalein als Indicator titrimetrisch ermittelt.

1. Versuch.

1 g Serumalbumin in 100 ccm H_2O gelöst:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	=	2,0 ccm
verbrauchte $^n/_{10}$-KOH	=	0,9 „
		1,1 ccm

Es wurde also 1,1 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,0099 g vom Eiweiß gebunden = 55% der zugesetzten Menge.

2. Versuch.

1 g Serumalbumin — 100 ccm H_2O:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	=	4,0 ccm
verbrauchte $^n/_{10}$-KOH	=	1,6 „
		2,4 ccm

Gebundene Milchsäuremenge also 2,4 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,0216 g = 60% der zugesetzten Menge.

3. Versuch.

1 g Serumalbumin — 100 ccm H_2O:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	=	6,0 ccm
verbrauchte $^n/_{10}$-KOH	=	2,3 „
		3,7 ccm

Gebundene $^n/_{10}$-Milchsäuremenge = 3,7 ccm = 0,0333 g = 61,7% der zugesetzten Menge.

4. Versuch.

1 g Serumalbumin — 100 ccm H_2O:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	=	12,0 ccm
verbrauchte $^n/_{10}$-KOH	=	6,1 „
		5,9 ccm

Da das Eiweiß bei dieser Säuremenge sich nicht mehr koagulierbar erwies, habe ich nach dem Aufkochen 30 ccm 95%igen Alkohol und Magnesiumsulfat zugesetzt, dann erst abgenutscht.

Die gebundene $^n/_{10}$-Milchsäuremenge ist also 5,9 ccm = 0,0531 g = 49,1% der zugesetzten Menge.

5. Versuch.

1 g Serumalbumin — 100 ccm H_2O:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	=	18 ccm
verbrauchte $^n/_{10}$-KOH	=	11 „
		7 ccm

Es war eine Zugabe von 30 ccm Alkohol und Sättigung mit Magnesiumsulfat erforderlich.

Es wurde also 7 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,063 g = 88,8% vom Eiweiß gebunden.

Ein Blick auf die folgende Kurve, in der die zugesetzten Milchsäuremengen als Abszissen aufgetragen sind, als Ordinate jedoch der prozentuelle Anteil jener Milchsäuremenge, die vom Eiweiß gebunden worden war und bei der Titration nicht mehr zum Vorschein kam, ergibt, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen ein sehr erheblicher Anteil der vorhandenen Milchsäure, unter Umständen mehr als die Hälfte derselben, der Titration entgangen ist.

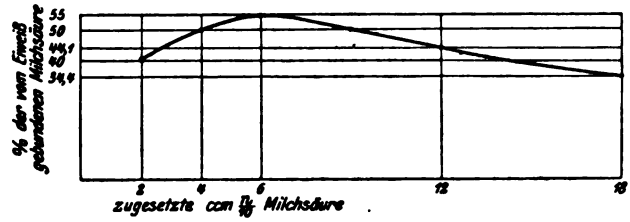


Fig. 1.

Ich mußte daher, um auch den gebundenen Anteil der Milchsäure der Bestimmung zuzuführen, ein Mittel ausfindig machen, um die Milchsäure aus ihrer Eiweißbindung zu befreien.

Als solches ergab sich mir die Einwirkung von Alkali, welches das milchsaure Eiweiß unter Bildung von Alkalieiweiß und milchsaures Alkali zerlegte.

Nach verschiedenen Vorversuchen ergab sich mir folgender Weg als gangbar.

Die mit Milchsäure versetzte wässerige Serumalbuminlösung wurde durch Auskochen auskoaguliert und nunmehr, ohne das Koagulum durch Filtration zu beseitigen, mit Alkali versetzt und einige Minuten lang gekocht.

Sodann wurde durch Säurezusatz (H_2SO_4) bis zu schwach alkalischer Reaktion abgestumpft, mit einem Gemenge von Magnesiumsulfat und Kochsalz in Substanz gesättigt (wobei man sich durch Tüpfeln auf Lackmus überzeugte, daß die Lösung alkalisch blieb) und filtriert.

Das Filtrat wurde in einem 500 ccm-Kolben gesammelt, der Niederschlag durch Dekantation mit heißem, mit einigen Tropfen Lauge versetztem Wasser gewaschen, nunmehr auf 500 ccm aufgefüllt; die Hälfte des Filtrates zur weiteren Analyse

verwendet und der Milchsäurebestimmung nach v. Fürth und Charnaß (die in der voranstehenden Arbeit beschrieben worden ist) unterworfen.

Beim Säurezusatz im Oxydationskolben tritt eine von Eiweißspuren herrührende milchige Trübung auf, die jedoch die Bestimmung in keiner Weise beeinträchtigt.

1. Versuch.

5 g Serumalbumin wurden in 150 ccm H_2O gelöst und mit 25 ccm Milchsäure vom Titer = 26,55 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,2389 g versetzt.

Die Bestimmung ergab:

47,1 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,2355 g Milchsäure.

Ausbeute = 98,5%.

Ein Parallelversuch durch direkte Titration des vom Koagulum abgenutschten Filtrates ergab eine

Ausbeute = 36,7%,

der Verlust betrug demnach 61,8%.

2. Versuch.

5 g Serumalbumin; 150 ccm H_2O; zugesetzt 32,4 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,2916 g Milchsäure.

Analyse: 58,2 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,291 g Milchsäure.

Ausbeute = 99,8%.

Parallelversuch durch direkte Titration:

Ausbeute = 35,5%,

also ein Verlust von 64,3%.

3. Versuch.

5 g Serumalbumin; 150 ccm H_2O; zugesetzt 43,3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,3897 g Milchsäure.

Die Analyse ergab:

77,6 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,388 g Milchsäure.

Ausbeute = 99,5%.

Auf alkalimetrischem Wege:

Ausbeute = 39,2%,

ein Verlust von 60,3%.

4. Versuch.

5 g Serumalbumin; 150 ccm H_2O; zugesetzt 54 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,486 g Milchsäure.

Die Milchsäurebestimmung ergab:

96,1 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,4805 g Milchsäure.

Ausbeute = 98,8%.

Durch Titration ermittelt:

Ausbeute = 43,8%,

Verlust = 55%.

Wie aus vorstehenden Versuchen hervorgeht, war die Ausbeute demnach eine quantitative.

2. Milchsäurebestimmungen in Lösungen von Muskeleiweißkörpern.

Da die Organeiweißkörper, insbesondere die von v. Fürth[1]) genau studierten Muskeleiweißkörper, sich durch ihr chemisches Verhalten von dem Serumalbumin in ihren chemischen Eigenschaften weitgehend unterscheiden, die letzteren aber insbesondere durch die Leichtigkeit ausgezeichnet sind, mit der sie in Acidalbumine (Syntonine) übergehen, erschien es nicht überflüssig, das Verhalten von Milchsäure gegen rein dargestelltes Muskeleiweiß besonders zu studieren.

Ich stellte mir zu diesem Zwecke Myogen, das nach v. Fürths Untersuchungen unter den Muskeleiweiskörpern im Vordergrunde steht, nach einem von dem Genannten ausgearbeiteten Verfahren dar[2]) [3]) [4]).

2 kg frischen, fein zerkleinerten Pferdefleisches wurden unter Zugabe von Quarzsand mit 0,7%iger Kochsalzlösung zu einem dicken Brei verrieben; der Brei wurde sodann nach Zugabe von 2 l physiologischer Kochsalzlösung unter zeitweisem Umrühren 18 Stunden in der Kälte stehen gelassen.

Sodann wurde koliert und abgepreßt, die trübe Flüssigkeit durch Zusatz von $^5/_4$ Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt; dabei fällt der globulinartige Eiweißkörper des Muskelplasmas, das Myosin, aus.

Nach Absitzen des Niederschlages wurde die überstehende, klare Flüssigkeit abgehebert und mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt.

Der nunmehr ausfallende Myogenniederschlag wurde durch ein Faltenfilter abgetrennt, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und zwischen Filterpapier abgepreßt.

Der Myogenniederschlag wurde unter Vermeidung von Trocknung, wobei er einen Teil seiner Löslichkeit eingebüßt hätte, in Wasser gelöst.

Eine Bestimmung ergab in 10 ccm 0,353 g Myogen.

Die Milchsäurebindungsversuche wurden nunmehr in ganz analoger Weise wie beim Serumalbumin durchgeführt, mit der

[1]) O. v. Fürth, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **36**, 1895.

[2]) O. v. Fürth, Oppenheimers Handb. d. Biochem. 2, 244, 2. Teil.

[3]) Kühne und Chittenden, Myosin und Myosinosen. Zeitschr. f. Biol. 7, 1899.

[4]) Halliburton, On muscle plasma. Journ. of Physiol. 8, 1888.

Abweichung jedoch, daß zur Titration nicht Phenolphthalein, sondern Lackmus als Indicator verwendet wurde.

Phenolphthalein erwies sich bei Anwesenheit von Ammonsulfat zum Zwecke der Titration als völlig unbrauchbar. Wie schon Cleef[1]) nachgewiesen hat, wird Phenolphthalein in ganz verdünnter Alkalilauge bei Zusatz von Ammonsalzen entfärbt.

Lenk und ich[2]) haben in einer eigenen Untersuchung uns mit der Aufgabe beschäftigt, die hierbei obwaltenden Verhältnisse klar zu legen; wir konnten uns überzeugen, daß die Verschiebung des Neutralisationspunktes auch bei Anwendung anderer Neutralsalze erfolgt.

1. Versuch.

1 g Myogen (28,3 ccm der Lösung) auf 100 ccm mit H_2O verdünnt:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	= 2,0 ccm
zurücktitriert mit $^n/_{10}$-KOH	= 1,2 „
	0,8 ccm

Die vom Eiweiß zurückgehaltene $^n/_{10}$-Milchsäuremenge war also 0,8 ccm = 0,0072 g = 40% der zugesetzten Menge.

2. Versuch.

1 g Myogen — 100 ccm H_2O:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	= 4 ccm
zurücktitriert	= 2 „
	2 ccm

Vom Eiweiß zurückgehalten 2 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,018 g = 50% der zugesetzten Menge.

3. Versuch.

1 g Myogen — 100 ccm H_2O:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	= 6,0 ccm
verbrauchte $^n/_{10}$-KOH	= 2,3 „
	3,7 ccm

Das Eiweiß bindet 3,7 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,0297 g = 55%.

---

[1]) Cleef, Demonstrierung der Wirkung normaler Salze auf Lösungen, die Hydroxylionen enthalten. Rec. trav. chim. Pays-Bas 20, 1901; C. B. 1901, II.

[2]) E. Lenk und Mondschein, Der gleichzeitige Einfluß von Alkohol und Neutralsalz auf die Empfindlichkeit des Phenolphthaleins. Chem.-Zeitg. 57, 534.

4. Versuch.

1 g Myogen — 100 ccm H_2O:

$^n/_{10}$-Milchsäuremenge	=	12,0 ccm
zurücktitriert	=	6,7 „
		5,3 ccm

Vom Eiweiß gebunden sind also 5,3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,0477 g = 44,1%.

5. Versuch.

1 g Myogen — 100 ccm H_2O:

zugesetzte $^n/_{10}$-Milchsäure	=	18,0 ccm
verbrauchte $^n/_{10}$-KOH	=	11,8 „
		6,2 ccm

Gebunden vom Eiweiß 6,2 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,0558 g = 34,4% der zugesetzten Menge.

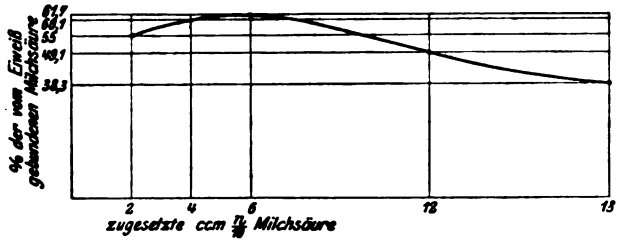


Fig. 2.

Die vorstehende Kurve, wo wiederum die zugesetzten Milchsäuremengen als Abszisse, die prozentualen Mengen verschwundener Milchsäure als Ordinate aufgetragen sind, belehrt uns darüber, daß hier ganz ähnliche Verhältnisse obwalten, wie wir sie für Serumalbumin festgestellt haben.

Die Bestimmung der Milchsäure bei Gegenwart von Myogen ließ sich hier wiederum in ganz analoger Weise durchführen wie beim Serumalbumin, indem die Bindung der Milchsäure an das Eiweiß auch hier durch einen Alkaliüberschuß gelöst wurde.

1. Versuch.

2,5 g Myogen, zugesetzt 30 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,27 g, verarbeitet genau wie bei Serumalbumin angegeben.

Die Milchsäurebestimmung ergab: 52,6 ccm $^n/_{10}$-J, entsprechend 0,263 g Milchsäure.

Ausbeute = 97,4%.

Gleichzeitig wurde parallel (mit denselben Mengen ausgeführter Versuch) das Filtrat vom Koagulum getrennt mit $^n/_{10}$-Lauge titriert:

Ausbeute = 55,8 %;

es würden also 41,6 % der Bestimmung entgehen.

2. Versuch.

5 g Myogen,
40 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,36 g.
Analyse: 70,2 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,351 g Milchsäure.

Ausbeute = 97,5 %.

Auf alkalimetrischem Wege konnte nur eine

Ausbeute = 45,5 %

erzielt werden; der Verlust betrug also 52 % der zugesetzten Menge.

3. Versuch.

3 g Myogen,
15 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,135 g.
Bestimmung: 26,5 ccm $^n/_{10}$-J, entsprechend 0,1325 g Milchsäure.

Ausbeute = 98,1 %.

Parallelversuch:

Ausbeute = 45,1 %.

53 % der zugesetzten Menge nicht bestimmbar.

4. Versuch.

5 g Myogen,
50 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,45 g.
Analyse: 88,5 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,4425 g Milchsäure.

Ausbeute = 98,3 %.

Titimetrisch ermittelt:

Ausbeute = 50 %;

der Bestimmung entzogen also 48,3 % der zugesetzten Menge.

Auch hier konnten wiederum quantitative Milchsäureausbeuten erzielt werden.

3. Milchsäurebestimmung im Muskelgewebe.

Um die Milchsäurebestimmung im Muskelfleische durchzuführen, ging ich nunmehr derart vor, daß ich abgewogene Mengen fein zerkleinerten Muskelfleisches in üblicher Weise mit kochendem Wasser erschöpfte und den Extrakt sowie das Koagulum für sich weiter untersuchte.

Die Milchsäurebestimmung im klaren, wässerigen Extrakte wurde nun, wie dies vielfach früher geschehen ist, auf alkalimetrischem Wege unter Anwendung von Phenolphthalein als Indicator durchgeführt.

Da das klare, gelbe Filtrat stets geringe Mengen eiweißartiger Substanzen enthält, die in der Literatur als „Albumosen" u. dgl. bezeichnet zu werden pflegen, deren Natur jedoch nicht genau festgestellt erscheint, ergab sich mir zunächst die Vorfrage, ob die Gegenwart derartiger Kolloide die Titration unter Anwendung von Phenolphthalein unsicher macht[1]).

Ich habe daher jene Mengen Eiweiß (die hier nach den Ermittlungen von v. Fürth und Schwarz praktisch in Betracht kommen) in Form von Serumalbumin und Myogen zugesetzt und sodann die Titration bekannter zugesetzter Milchsäuremengen vorgenommen.

1. Versuch.

150 ccm Wasser, zugesetzt 30 ccm Milchsäure, titriert mit $^n/_{10}$-KOH = 31,4 ccm.

Parallel: 150 ccm Wasser, zugesetzt 30 ccm Milchsäure und 0,3 g Serumalbumin, titriert mit $^n/_{10}$-KOH = 31,4 ccm.

Ausbeute = 100 %.

2. Versuch.

100 ccm Wasser, 40 ccm Milchsäure, titriert mit $^n/_{10}$-KOH = 41,9 ccm.

Parallel: 100 ccm H_2O, 40 ccm Milchsäure, 0,4 g Serumalbumin; die Titration ergab 41,85 ccm $^n/_{10}$-KOH.

Ausbeute = 99,9 %.

3. Versuch,

100 ccm H_2O, 35 ccm Milchsäure; Titration = 36,75 ccm $^n/_{10}$-KOH.

Parallel: 100 ccm H_2O, 35 ccm Milchsäure, 0,35 g Myogen, titriert mit $^n/_{10}$-KOH = 36,75 ccm.

Ausbeute = 100 %.

Es ergibt sich, daß derartige kleine Kolloidmengen die Titration der Milchsäure in keiner Weise beeinträchtigen.

Eine andere Frage, die weiter gelöst werden mußte, war aber die, ob die alkalimetrische Bestimmung der Milchsäure in Muskelextrakten überhaupt an sich zulässig ist; es wäre ja im vorhinein sehr wohl denkbar, daß sich die Milchsäure in Muskelextrakten nicht durchweg in freiem, titrierbarem Zustande vorfindet.

Auch mußte man an die Möglichkeit denken, daß sich neben der Milchsäure auch andere freie Säuren in beachtenswerten Mengen vorfinden könnten.

[1]) B. T. Robertson, Journ. of Physic. Chem. 10, 1906.

Um diese Möglichkeit zu prüfen, habe ich Extrakte aus Pferdefleisch in der vorher beschriebenen Weise dargestellt, das Filtrat aber geteilt: Die eine Hälfte wurde titriert, die andere Hälfte jedoch der Milchsäurebestimmung nach v. Fürth und Charnaß unterworfen.

1. Versuch.

50 g Muskel, Extrakt 200 ccm halbiert, 100 ccm mit $^n/_{10}$-KOH titriert = 13,5 ccm.

Parallel: 100 ccm zur Milchsäurebestimmung verwendet.

23,2 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,116 g Milchsäure = 12,9 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Ausbeute = 95,6 %

des mittels Titration ermittelten Wertes.

2. Versuch.

Extrakt 200 ccm halbiert: 100 ccm titriert mit $^n/_{10}$-KOH = 29,2 ccm.

Parallel: 100 ccm zur Analyse.

51,5 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,2575 g = 28,6 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Ausbeute = 97,9 %

des auf alkalimetrischem Wege ermittelten Wertes.

3. Versuch.

100 g Muskel, Extrakt 300 ccm, 150 ccm mit $^n/_{10}$-KOH titriert = 32,4 ccm.

Parallel: 150 ccm zur Milchsäurebestimmung verwendet.

56,5 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,2825 g = 31,4 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Ausbeute = 96,7 %.

Wie aus den mitgeteilten Versuchen ersichtlich, ist die Übereinstimmung der durch beide Methoden gewonnenen Resultate eine so gute, daß in der Tat die titrimetrische Ermittlung des im Kochextrakt enthaltenen Milchsäureanteils durchaus zulässig erscheint.

Die Milchsäurebestimmung in Extrakten unterliegt also nicht den geringsten Schwierigkeiten.

Schwieriger gestaltet sich dagegen die Bestimmung jenes von früheren Untersuchern nicht beachteten, jedoch keineswegs zu vernachlässigenden Milchsäureanteils, der sich in dem Hitzekoagulum, an Eiweiß gebunden, findet.

Das für Serumalbumin und reines Myogen ermittelte Verfahren erwies sich hier nicht ohne weiteres anwendbar, und zwar aus dem Grunde nicht, weil sich das Muskelkoagulum bei Zusatz von Lauge alsbald zu einer steifen, unfiltrierbaren Albu-

minatgallerte umgestaltet[1]), deren weitere Behandlung eine Reihe von Vorversuchen erforderte.

1. Versuch.

(Entquellung der Gallerte durch Kochsalzzusatz.)

50 g frischen Katzenmuskels mit Wasser ausgekocht; das Filtrat ergab bei Titration mit $^n/_{10}$-Lauge (Indicator Phenolphthalein) eine Acidität, entsprechend: 100 g Muskel — 54 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Das Koagulum wurde in 30%iger Kochsalzlösung suspendiert, nach Zusatz von 4 ccm NaOH (10%) gekocht, filtriert, durch Dekantation gewaschen; im Filtrate fand sich nach der durchgeführten Milchsäurebestimmung nach v. Fürth und Charnaß eine Milchsäuremenge, entsprechend 6 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure, i. e. 11,1% der im Filtrate enthaltenen Menge.

2. Versuch.

Wiederholung des vorigen Versuchs, mit der Abweichung jedoch, daß nach Säurezusatz vor der Permanganatoxydation ausgekocht wurde, um etwa noch vorhandenen Schwefelwasserstoff, der bei der jodometrischen Bestimmung stören könnte, zu vertreiben.

Filtrat: 66 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure
Koagulum: 7 „ „

entspricht 11,0% der im Filtrate enthaltenen Menge.

3. Versuch.

Analog durchgeführt, jedoch gelangte als Entquellungsmittel statt Kochsalz Ammonsulfat zur Anwendung.

Filtrat: 58 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure
Koagulum: 2 „ „

entsprechend 3,4% der im Filtrate enthaltenen Menge.

4. Versuch.

Wiederholung des 3. Versuchs.

Filtrat: 76,0 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure
Koagulum: 2,4 „ „ = 3,1%.

Die Menge der bei obigen Versuchen aus dem Koagulum erhaltenen Milchsäure war auffallend geringer als jene Menge, die sich bei analogen Versuchen bei Serumalbumin und Myogen vorgefunden hatte.

---

[1]) Lieberkühn, Arch. f. anat. Physiol. u. wiss. Med. 1848. — Magendie, Leçons sur le sang. Paris 1836. — Johnsson, Journ. of the Chem. Soc., N. S. 12. — Rollet, Sitzungsber. d. Wien. Akad., math.-naturw. Kl., Abt. III, 84, 1881. — Zoth, ibid. 100, 1891. — Kieseritzky, Die Gerinnung des Faserstoffes, Alkalialbuminats und Acidalbumins. Dissert. Dorpat 1882. — Rosenberg, Dissert. Dorpat 1883.

Für die Ammonsulfatversuche ergab sich alsbald eine Erklärung aus dem Umstande, daß das Ammonsulfat, das sich mit der Lauge unter Ammoniakentwicklung umsetzt, das Alkali tatsächlich nicht zur Wirkung gelangen läßt.

Wie sollte man aber das Fehlschlagen der Kochsalzversuche erklären?

Um mich zu vergewissern, daß das Muskeleiweiß in seinem organischen Gefüge ebenso befähigt ist, Milchsäure zu binden, wie die isolierten Eiweißkörper, habe ich eine abgewogene Milchsäuremenge zu Muskelbrei hinzugefügt: 20 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure zu 50 g Muskel und auskoaguliert; auch hier ergab wieder die Titration ein Manko von etwa $50\,\%$.

Ich konnte also an einer Fähigkeit der Muskeleiweißkörper, Milchsäure zu binden, tatsächlich nicht zweifeln, mußte daher annehmen, daß die bisher versuchten Methoden nicht geeignet gewesen waren.

Für die Kochsalzversuche suchte ich darin die Erklärung, daß die Neutralsalze, indem sie das Albumin ausfällen, die Umwandlung desselben in Alkalialbuminat oder Acidalbumin verzögern oder ganz verhindern[1]).

5. Versuch.

Bei weiteren Versuchen ging ich derart vor, daß ich zur Entquellung der Alkaligallerte statt der Neutralsalze Zusatz von Aceton angewendet habe.

Doch auch hier war das Ergebnis kein besseres:

Filtrat: 60 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure
Koagulum: 5 „ „ $= 8{,}3\,\%$.

(Natürlich wurde vor der Milchsäurebestimmung das Aceton vertrieben.)

Ich gelangte schließlich in der Weise zum Ziele, daß ich das Alkali auf das milchsäurehaltige Koagulum in der Wärme und in erhöhter Konzentration so lange einwirken ließ, bis eine völlige Verflüssigung des Koagulums stattgefunden hat.

Ich gehe nunmehr zur Beschreibung jener Methode über die sich mir schließlich als brauchbar erwiesen hat.

---

[1]) Eichwald, Beitr. z. Chem. d. gewebebild. Subst. u. ihrer Abkömmlinge HJ. Berlin 1873. — Hofmeister, Zeitschr. f. anal. Chem. 20, 1881.

4. Methode.

Eine abgewogene Menge fein zerkleinerten Muskels, etwa 50 g, wird in 60 bis 80 ccm Wasser suspendiert, durch Aufkochen koaguliert, das Koagulum auf ein Nutschfilter gebracht und dreimal mit kochendem Wasser gewaschen, bis schließlich keine saure Reaktion mehr nachweisbar ist.

Das Filtrat wird mit $^n/_{10}$-Lauge unter Zusatz von Phenolphthalein titriert (Fraktion des Filtrats).

Das scharf abgenutschte Koagulum wird vom Filter genommen und mit 50 ccm Wasser in einem Becherglase verteilt; hierauf fügt man 10 ccm NaOH (10%) hinzu.

Dabei verwandelt sich die ganze Masse in eine steife Gallerte. Nunmehr wird vorsichtig, unter Vermeiden von Überschäumen, aufgekocht, wobei sich die ganze Masse bis auf wenige Klümpchen verflüssigt; hierauf wird die Lösung mit 100 ccm einer gesättigten Kochsalzlösung versetzt, aufgekocht und in der Siedehitze mit Kochsalz in Substanz gesättigt.

Dabei fällt weitaus der größte Teil des Eiweiß in Form einer klumpigen Masse aus, während nur ein geringer Teil in Lösung verbleibt.

Der Niederschlag wird nunmehr abgenutscht, mit einer heißen gesättigten Kochsalzlösung gut gewaschen, das Filtrat in einem $^1/_2$ l-Meßkolben bis zur schwach sauren Reaktion mit Schwefelsäure versetzt, wobei der in Lösung gegangene Eiweißrest ausfällt; von der auf 500 ccm aufgefüllten Lösung wird die Hälfte durch ein trockenes Faltenfilter abfiltriert und die Milchsäurebestimmung nunmehr nach dem Vorgang von v. Fürth und Charnaß vorgenommen.

Zweckmäßigerweise wird die mit Schwefelsäure angesäuerte Lösung vor Beginn der Bestimmung 10 Minuten lang gekocht, um den vorhandenen Schwefelwasserstoff auszutreiben.

Eine sich nach dem Säurezusatz persistierende, schwach milchige Trübung stört die Bestimmung in keiner Weise (Fraktion des Koagulums).

Durch Addition der in der Fraktion des Filtrats und in der Fraktion des Koagulums enthaltenen Milchsäurewerte erhält man die Gesamtmenge der in der Fleischprobe enthaltenen Milchsäure.

5. Analysen.

1. 100 g Pferdefleisch.

Filtrat — 54 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 30 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,15 g Milchsäure = 16,7 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure[1]).

Mehrausbeute (aus Koagulum) = 30,9 %

Summe = 54 + 16,7 = 70,7 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

2. 100 g Pferdefleisch.

Filtrat — 56 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 28 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,14 g = 15,6 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 27,8 %

Summe = 71,6 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

3. 100 g Rindfleisch.

Filtrat — 48 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 19,5 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,0975 g = 10,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 22,5 %

Summe = 58,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

4. 100 g Kalbfleisch.

Filtrat — 29,6 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 28,4 ccm $^n/_{10}$-J entspicht 0,142 g = 15,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 53,4 %

Summe = 54,4 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

5. 100 g Schweinefleisch.

Filtrat — 34 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 19,5 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,0975 g = 10,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 31,8 %

Summe = 44,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

6. 100 g Wildschwein.

Filtrat — 36 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 23 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,115 g = 12,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 35,6 %

Summe = 48,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

7. 100 g Hundefleisch.

Filtrat — 42 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 33 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,165 g = 18,3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 43,6 %

Summe = 60,3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

---

[1]) Dabei gelangt statt der theoretischen Relation 1 ccm $^n/_{10}$-Jod → $^1/_2$ ccm $^n/_{10}$-Milchsäure (= 0,0045 g) der von Fürth und Charnaß empirisch ermittelte Faktor 0,005 zur Anwendung.

8. 100 g Katze.

Filtrat — 75 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 34 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,17 g = 19 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 25,3 %

Summe = 94 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

9. 100 g Katze.

Filtrat — 78 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 40 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,2 g = 22,2 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 28,3 %

Summe = 100,2 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

10. 100 g Hundefleisch.

Filtrat — 56 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 31 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,155 g = 17,2 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 30,7 %

Summe = 73,2 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

11. 100 g Kaninchen.

Filtrat — 52 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 33 ccm $^n/_{10}$-Jod entspricht 0,165 g = 18,3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 35,2 %

Summe = 70,3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

12. 100 g Rindfleisch.

Filtrat — 76 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 42 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,21 g = 23,3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 30,7 %

Summe = 99,3 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

13. 100 g Schöpsenfleisch.

Filtrat — 46 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 26 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,13 g = 14,4 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 31,3 %

Summe = 60,4 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

14. 100 g Rindfleisch.

Filtrat — 60 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Koagulum: 32 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,16 g = 17,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Mehrausbeute = 29,7 %

Summe = 77,8 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Wie man aus den mitgeteilten Versuchen ersieht, hat die Vernachlässigung der in dem Koagulum enthaltenen Milchsäuremenge zum Übersehen eines sehr

erheblichen Milchsäureanteils (im Mittel 32,6%, also rund $^1/_3$ der im Kochextrakt enthaltenen Menge) geführt.

6. Fehlerquellen.

Es erübrigt sich nunmehr eine Reihe von Fehlerquellen zu erörtern, die die Resultate dieser Methode ev. zu trüben geeignet wären.

1. Phosphorsäure. Muskelextrakte enthalten zweifellos eine kleine Menge freier Phosphorsäure, die der postmortalen Spaltung von Lecithiden und anderen Komplexen entstammt; man hat der Phosphorsäure einen in Betracht kommenden Anteil an den Vorgängen postmortaler Muskelsäuerung zugeschrieben, doch kommt, wie die obigen mitgeteilten Parallelversuche zwischen Titration und Milchsäurebestimmung in Muskelextrakten ergeben haben, die Phosphorsäure tatsächlich für die Acidität der Extrakte praktisch in keiner Weise in Betracht.

2. β-Oxybuttersäure. Man konnte daran denken, daß auch die β-Oxybuttersäure den sauren Bestandteil des Muskels bildet. Ich habe nun, um mir ein Urteil über die Deutung dieser Möglichkeit zu verschaffen, die von mir ausgearbeitete neue Methode (s. d. voranstehende Arbeit) zur Bestimmung der β-Oxybuttersäure bei Gegenwart von Milchsäure dazu benutzt, um die β-Oxybuttersäure in Fleischproben zu bestimmen.

1. Versuch.

100 g Rindfleisch in H_2O suspendiert, auskoaguliert und abgenutscht; das Filtrat zur Analyse verwendet:

6 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,0104 g β-Oxybuttersäure = 1 ccm $^n/_{10}$-β-Oxybuttersäure.

2. Versuch.

1000 g Pferdefleisch auskoaguliert, Filtrat eingeengt, mit Phosphorwolframsäure noch einmal das Eiweiß gefällt und das so gewonnene eiweißfreie Filtrat zur Analyse benützt:

3 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,052 g = 5 ccm $^n/_{10}$-β-Oxybuttersäure; auf 100 g also 0,5 ccm $^n/_{10}$-β-Oxybuttersäure.

3. Versuch.

Wiederholung des 1. Versuches:

4,8 ccm $^n/_{10}$-J entspricht 0,0083 g = 0,8 ccm $^n/_{10}$-β-Oxybutters. Im Mittel also auf 100 g Muskel — 0,77 ccm $^n/_{10}$-β-Oxybuttersäure.

Durch die mitgeteilten Bestimmungen scheint das Vorkommen der β-Oxybuttersäure unter den normalen Muskelbestandteilen erwiesen; doch sind die β-Oxybuttersäuremengen bei den von mir untersuchten normalen Verhältnissen so gering, daß sie wenig außerhalb der Fehlerbreite der Titration fallen, die alkalimetrische Bestimmung also kaum zu berühren vermögen.

3. Glykogen und Zucker. Da wir wissen, daß die Gegenwart von Kohlenhydraten die Bestimmung der Milchsäure auf dem Wege des abgespaltenen Aldehyds zu stören vermag, werden wir diesen Faktor in Betracht zu ziehen haben; da aber die Milchsäurebestimmung im Extrakte am besten durch einfache Titration vorgenommen wird, kommt diese Fehlerquelle nicht weiter in Betracht.

Hinsichtlich des Glykogens, das ja auch zum größten Teile durch Wasserextraktion entfernt wird, wäre immerhin die Möglichkeit gegeben, daß dem Koagulum anhaftende Reste desselben, indem sie bei der Permanganatoxydation geringe Mengen flüchtiger, jodbindender Substanzen liefern, die Resultate der Milchsäurebestimmung um ein geringes erhöhen könnten.

In praxi kann jedoch diese Fehlerquelle nur bei Verarbeitung ganz frischer Muskeln in Betracht kommen, da ja das Glykogen, wie bekannt, außerordentlich schnell einer postmortalen, fermentativen Verzuckerung anheimfällt[1]).

Nachschrift.

Erst nach Niederschrift dieser Arbeit kam mir eine Arbeit von Neubauer (München, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden **5**, II, 1912) zu Gesichte, in der sich auch eine anhangsweise Bemerkung über Bestimmung der Milchsäure in Muskeln (S. 1258) vorfindet.

Neubauer empfiehlt, Muskelpreßsaft mit Sublimat und Salzsäure zu enteiweißen und die Milchsäure nach Beseitigung des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff bei phosphorsaurer Reaktion im Lindtschen Apparat zu extrahieren.

Ich behalte die kritische Erörterung dieses Verfahrens der im Gange befindlichen Untersuchungen vor, in denen ich mich mit der Bestimmung der Milchsäure in verschiedenen Organen, im Harn und in der Milch beschäftige.

---

[1]) Arthus und Huber, Arch. de Physiol. **5**, 4. — Pick, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**. — Bial, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. **1901**.

7. Zusammenfassung.

1. Die bisher vorliegenden Angaben über den Milchsäuregehalt der Muskeln erscheinen zu klein, da etwa $^1/_3$ der vorhandenen Milchsäure, die beim Auskoagulieren des Gewebes durch Eiweißbindung im Koagulum verbleibt, der Bestimmung entgangen ist.

2. Die im Kochextrakt des Muskels vorhandene Milchsäure kann durch Titration (unter Anwendung des Phenolphthaleins als Indicator) mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden, da die gesamte, nachweisbare Milchsäuremenge darin in freier Form enthalten ist, andere sauere Produkte aber nicht in praktisch in Betracht kommender Menge vorhanden sind.

3. Der normale Muskel enthält kleine Mengen freier β-Oxybuttersäure, die jedoch, zumindestens unter normalen Verhältnissen, anscheinend für die Acidität des Muskels kaum in Betracht kommen.

4. Der im Eiweißkoagulum enthaltene Milchsäureanteil kann der Bestimmung derart zugeführt werden, daß das erstere durch Lauge verflüssigt, die albuminathaltige Lösung durch Zusatz gesättigter Kochsalzlösung enteiweißt wird.

Die im eiweißfreien Filtrate enthaltene Milchsäure kann nach dem Verfahren von v. Fürth und Charnaß durch Oxydation mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung und Bestimmung der abgespaltenen Aldehydmenge ermittelt werden.

5. Die Gesamtmenge der im Muskel enthaltenen Milchsäure ergibt sich durch Addition der im Kochextrakte und Hitzekoagulum enthaltenen Quantitäten.

Chemische und biochemische Untersuchungen über das Nervensystem unter normalen und pathologischen Bedingungen.

Von

Giacomo Pighini.

I. Mitteilung.

Über die Indophenol-Oxydase im Zentralnervensystem, in der Tela chorioidea und in der Cerebrospinalflüssigkeit.

Von

Giacomo Pighini.

(Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium des Psychiatrischen Instituts in Reggio Emilia.)

(Eingegangen am 14. Mai 1912.)

Mit 3 Tafeln.

Zahlreiche, übereinstimmende Untersuchungen über die Physiologie und experimentelle Pathologie haben nunmehr festgestellt, welche fundamentale Bedeutung der Vorgang der Oxydierung für die normale Funktion des Zentralnervensystems hat.

Der bekannte Versuch Stensons betreffs beiderseitiger Unterbindung der Carotiden und der Ao. vertebralis beim Zentralnervensystem und die banale Beobachtung der Kompression der Arterien der Gelenke beim peripherischen Nervensystem lehren uns, daß eine kurze Unterbrechung des Blutkreislaufes, durch die die Oxydation des Gewebes aufgehoben wird, genügt, um momentan die Funktionen des Denkvermögens, der Sinnesorgane und der Bewegung in ihm aufzuheben, die wiederhergestellt werden, sobald das Blut die Nervenelemente wieder bespült. Wenn jedoch das Bedürfnis nach Sauerstoff auch eine wesentliche Lebenserscheinung des Nervengewebes ist, so scheint es sich doch nicht in einem größeren Verbrauch als bei den anderen Geweben zu äußern.

Die diesbezüglichen Untersuchungen sind nicht sehr zahlreich und stimmen auch nicht ganz miteinander überein; nach Winterstein[1]), der den Sauerstoffverbrauch des Nervengewebes vermittelst des Thunbergschen Respirometers gemessen hat, soll das Rückenmark des Frosches einen pro Gewichtseinheit 5 mal größeren Gasaustausch haben, als der des ganzen Organismus beträgt. Aber die vorausgehenden Untersuchungen von Hill und Nabarro[2]) — welche Autoren den Sauerstoff und die Kohlensäure des Blutes der Torcula Herophili und der Carotis vergleichend mit dem Sauerstoff und der Kohlensäure des A. femoralis und der Carotis quantitativ bestimmten — und die gleichzeitigen von Best[3]) und von Battelli und Stern[4]) über den Gasaustausch des zerfallenen Nervengewebes in vitro führten zum entgegengesetzten Resultat, da sich ergab, daß die Sauerstoffabsorption und die Kohlensäureausscheidung im Hunde- und Pferdegehirn geringer als in den anderen Organen sind, und daß das katalytische Vermögen des Gehirns auf das Wasserstoffsuperoxyd 150 mal geringer als z. B. das der Leber ist.

Bekannt sind anderseits die sehr interessanten Untersuchungen P. Ehrlichs über das Sauerstoffbedürfnis der verschiedenen Organe, das aus dem Reduktionsvermögen gefolgert wurde, das sie auf spezielle Farbstoffe, wie Methylenblau oder Alizarinblau, ausüben können. Nach diesen Untersuchungen soll das Nervensystem zu den Organen gehören, die im Leben bei den genannten Farben keine Reduktion bewirken und erst nach dem Tode die Leukobase bilden, was nach der Anschauung Ehrlichs anzeigen soll, daß das Zentralnervensystem in vita und funktionierend mit Sauerstoff gesättigt ist oder wenigstens eine Sauerstoffspannung besitzt, die ausreicht und derart ist, daß sie den oxydierten Farbstoff erspart. Ehrlich selbst hatte eine andere colorimetrische Methode ersonnen, um das Reduktionsvermögen der einzelnen Organe zu erproben, eine Methode, die erst in jüngster Zeit wieder aufgenommen und mit neuen Kriterien beim Studium der Oxydasen der Gewebe verwendet worden ist: die Synthese des Indophenols aus den Mischungen von α-Naphthol und Dimethyl-p-Phenilendiamin. In seiner wohlbekannten 1885 erschienenen Monographie „Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus — Eine farbenanalytische Studie" wollte Ehrlich durch die synthetische Bildung des Indophenols in seinen beiden Formen Blau und Leukoprodukt das Reduktionsvermögen der Gewebe und mithin ihre Gier nach Sauerstoff abschätzen. Als er die beiden Stoffe, vermischt oder getrennt, in die Venen injizierte, fand er kurz danach bei der Autopsie eine deutliche blaue Farbe im Herzen, in den Nieren, Muskeln

[1]) Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebeatmung. Zeitschr. f. allg. Physiol. 6, 315, 1907.

[2]) Hill and Nabarro, On the exchange of blood-gases in brain and muscle during states of rest and activity. Journ. of Physiol. 18, 1895.

[3]) Best, Leçons sur la physiologie comparée de la respiration 1906.

[4]) Battelli und Stern, Journal de physiol. et pathologie générale 1907, No. 1, 2, 3.

und im Hirn, woraus er schloß, daß das Reduktionsvermögen in diesen Organen sehr schwach sei; dagegen nahm er bei den entfärbten Organen an, daß das Indophenolblau, das sich gebildet hatte, weiter zu Indophenolweiß reduziert worden sei.

Diese Erklärung wurde jedoch in der Folge für irrtümlich gehalten: das Leukoprodukt der Indophenolsynthese bildet sich nicht durch die Reduktion des gefärbten Produktes, wohl aber repräsentiert das letztere eine weitere Oxydationsphase des farblosen Produktes.

Röhmann und Spitzer[1]) erwiesen, wie der Prozeß sich abspielt: die Synthese des Indophenols durchläuft zwei aufeinanderfolgende Oxydationsphasen, von denen die erste die Leukoverbindung ist, die zweite die gefärbte Verbindung, nach folgender Formel:

$$C_6H_4(NH_2)_2 + C_{10}H_7OH + O = NH\begin{cases} C_6H_4NH_2 \\ C_{10}H_6OH \end{cases} + H_2O$$

$$NH\begin{cases} C_6H_4NH_2 \\ C_{10}H_6OH \end{cases} + O = N\begin{cases} C_6H_4NH_2 \\ C_{10}H_6O \end{cases} + H_2O$$

Diese allmählich dem Produkte bis zu seiner vollständigen Oxydation im Indophenolblau zugesetzten Sauerstoffatome können von der Atmosphäre geliefert werden, wenn die Mischung der beiden Stoffe lange Zeit hindurch der Luft ausgesetzt wird, oder auch unter augenfälliger Beschleunigung des Prozesses durch sowohl in den tierischen als pflanzlichen Geweben enthaltene spezielle Fermente. Die genannten Autoren Röhmann und Spitzer haben zuerst erkannt, daß verschiedene tierische Gewebe, wenn sie mit dem farblosen Gemisch der beiden Stoffe in Berührung gebracht werden, seine oxydative Synthese erleichtern; daraus haben sie gefolgert, in diesen Geweben müsse ein oxydierendes Ferment, eine Oxydase, enthalten sein.

Es ist hier nicht der Ort, die Lehre von den Oxydasen und ihren verschiedenen Einteilungen vorzutragen, je nachdem sie in Gegenwart von molekularem Sauerstoff oder von Superoxyden einwirken oder H_2O_2 unter Entwicklung von O_2 katalysieren. Gewiß ist, daß das auf die Synthese des Indophenolblaues einwirkende Ferment zur 1. Gruppe dieser Einteilung gehört, zu derjenigen, die Bach und Chodat unter der Bezeichnung „Oxygenasen" zusammenfassen, d. h. derjenigen albuminoiden Stoffe die, wie es scheint, sich mit dem biatomischen Sauerstoff zu einer Superoxydverbindung vereinigen und also ihren Sauerstoff an einen anderen Stoff abtreten. Zum Eintreten der Indophenoloxydase ist also erforderlich, daß sie in Anwesenheit von O_2 einwirkt; wie wir später sehen werden, gibt sie sich in den in vitro einwirkenden Geweben und außerhalb des Organismus nur zu erkennen in Anwesenheit des atmosphärischen Sauerstoffes.

---

[1]) Röhmann und Spitzer, Über Oxydationswirkungen tierischer Gewebe. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 28, 567, 1897.

Die Methode des Eintauchens der Gewebe in die Mischung, die je nach dem Oxydationsvermögen der ersteren in kürzerer oder längerer Zeit blau wird, wurde in der Folge auch von anderen Forschern angewendet. Nur Abelous und Biarnes[1]) sowie Rosell[2]) experimentierten unter anderem auch am Nervensystem; die ersteren fanden eine sehr schwache Reaktion darin, Rosell eine negative, während die Aldehydreaktion sich als positiv herausstellte.

Eine neue Verwendung fand die Indophenolreaktion bei den Untersuchungen Winklers[3]), der mikrochemisch die Anwesenheit und Verteilung der Oxydase in den Blutkörperchen zu bestimmen suchte, indem er fixierte Präparate anfertigte und Schnitte von Geweben — Milz, Lymphdrüsen, Knochenmark — behandelte, und bei den weiteren vollständigeren Untersuchungen von Lillie[4]) und Schultze[5]), die mit der Mischung Gefrierschnitte aus verschiedenen normalen und pathologischen Geweben behandelten.

Bezüglich des Zentralnervensystems also und seiner verschiedenen Bestandteile, wie Nervensubstanz, Tela choroidea, Cerebrospinalflüssigkeit, liegen bis jetzt keine speziellen Untersuchungen über die Anwesenheit und Verteilung der Indophenoloxydase vor, wenn wir von den mit ganz anderen Kriterien durchgeführten ersten Untersuchungen Ehrlichs, von den summarischen von Abelous und Biarnes sowie von denen von Rosell absehen, die an der in die Mischung Diamin-α-Naphthol getauchten Nervensubstanz in toto angestellt wurden und sich auf die Beobachtung der von der Mischung selbst angenommenen Färbung beschränkten.

Zur Ergänzung einer Reihe von Untersuchungen über die Chemie und Biochemie der Nervensubstanz, die eben in meinem Laboratorium angestellt werden, wollte ich eingehender die Frage der Indophenolsynthese studieren, die durch die verschiedenen das Zentralnervensystem bildenden Elemente bewirkt wird, indem ich zu diesem Zwecke die geeignetsten Untersuchungsmittel verwendete. Für das Zentralnervengewebe bediente ich mich der Imprägnierung von Stückchen Substanz,

---

[1]) Abelous et Biarnes, Hiérarchie des organes au point de vue du pouvoir oxydant. Compt. rend. Soc. de Biol. **8**, 262, 1876.

[2]) Rosell, Nachweis über Verbreitung intrazellulärer Fermente. Diss. Straßburg, 1901.

[3]) Winkler, Der Nachweis von Oxydase in den Leukocyten usw. Folia haematol. **55**, Heft 3, 1907.

[4]) Americ. Journal of Physiol. 7, 412.

[5]) W. H. Schultze, Die Oxydasereaktion an Gewebsschnitten und ihre Bedeutung für die Pathologie. Zieglers Beitr. **45**, 1907.

die ich verschiedenen Segmenten der cerebrospinalen Achse entnahm, in Mischungen zu gleichen Teilen von 1%igem α-Naphthol und 0,30%igem Dimethyl-p-Phenylendiamin in physiol. Lösung, und mikroskopischer Präparate, die ich aus über präparierten Deckgläsern ausgespannten Gefrierschnitten von frischer Substanz herstellte; dabei verdunstete ich über ihnen (sie waren nach Cesaris Demel erwärmt) eine Mischung zu gleichen Teilen der beiden Stoffe, die zu 1% in absolutem Alkohol gelöst waren, nach der von Sapegno[1]) angegebenen ausgezeichneten Methode. Ich werde meine Resultate beim Zentralnervengewebe, bei der Tela choroidea und bei der Cerebrospinalflüssigkeit getrennt beschreiben; sie beziehen sich auf Untersuchungen, die am Frosch, Huhn, Meerschweinchen, Kaninchen, Rind, Hund und am Menschen gemacht wurden.

Nervengewebe.

Taucht man ein Stückchen Zentralnervengewebe — Hirn, Bulbus, Mark —, das Teile sowohl der weißen als der grauen Substanz enthält, in die Mischung Diamin—Naphthol in physiol. Lösung ein, so beginnt die Flüssigkeit nach 1 bis 2 Stunden blau zu werden, und das Stückchen nimmt darin eine diffuse bläuliche Färbung an. Nimmt man das Stück aus der Flüssigkeit und durchschneidet es in der Mitte, so erscheinen die beiden Schnittflächen vollständig entfärbt; läßt man sie jedoch der Luft ausgesetzt, so beobachtet man nach wenigen Minuten, daß alle die graue Substanz enthaltenden Bezirke sich blau zu färben beginnen, während die übrigen Bezirke mit weißer Substanz völlig farblos bleiben; nach ungefähr $^1/_2$ Stunde hebt sich die graue Substanz deutlich von der weißen ab durch ihre intensiv blaue Farbe, die sich unverändert 1 bis 2 Tage lang erhält, während die weiße Substanz die Farbe gar nicht annimmt.

Um nachzuweisen, daß die durch die graue Substanz bewirkte Indophenolsynthese durch die Einwirkung eines spezifischen Fermentes bedingt ist, wiederholte ich das Experiment, indem ich Stückchen Nervengewebe 15 Min. lang in siedendem Wasser kochte und das Experiment auf die beschriebene Weise wiederholte; die Schnittflächen erhielten sich in diesen Fällen

[1]) M. Sapegno, A proposito della reazione de Winkler-Schultze. Pathologica 2, 131, 1910.

farblos, ohne sich weiter zu differenzieren. Auch untersuchte ich, ob die oxydierende Wirkung des Fermentes sich nur in Anwesenheit von atmosphärischem Sauerstoff kundgibt; zu diesem Zwecke durchschnitt ich die Gewebsstückchen, nachdem ich sie längere Zeit in die Mischung eingetaucht hatte, rasch in der Mitte und tauchte sie in geeignete, Kohlensäureanhydrid enthaltende Gefäße, in denen ich während der ganzen Dauer des Experimentes eine andauernde Strömung des Gases unterhielt. Nun blieben aber die in die Kohlensäure eingetauchten Schnittflächen auch nach 5 bis 6 Stunden, während die der Luft ausgesetzten Kontrollstücke sofort in gefärbte graue Substanz und farblose weiße Substanz differenziert wurden, nicht differenziert weiß und begannen, nachdem sie aus diesem Medium entfernt und wieder in Kontakt mit dem atmosphärischen Sauerstoff gebracht worden waren, langsam wieder wie die Kontrollstücke zu reagieren. Diese Versuche beweisen, daß in der grauen Substanz des Zentralnervensystems ein oxydierendes Ferment vom Typus der Oxygenasen (Bach und Chodat) enthalten ist, das in Anwesenheit von O_2 die Synthese des Indophenolblaus beschleunigt.

Um die Verteilung des Oxydationsfermentes in der grauen Substanz eingehender zu studieren, verwendete ich Gefrierschnitte (Gefrierapparat Leitz mit Kohlensäure), die ich über nach der Methode Cesaris-Dehmel (wie oben bemerkt) präparierten Objektträgern ausbreitete. (Da es durchaus nicht leicht ist dünne [10 bis 12 μ) und vollständige Gefrierschnitte aus frischem Nervengewebe zu erhalten, zog ich es vor, an frischem Material zu arbeiten, das nicht mit Formol fixiert war, da letzteres die Resultate hätte ändern können). Auf dem präparierten Objektträger ausgebreitete Rindenschnitte der Hemisphären und des Kleinhirns beginnen sich nach wenigen Minuten elektiv blau in den Bezirken der grauen Substanz zu färben, während die weiße Substanz farblos bleibt. Werden sie direkt unter dem Mikroskop untersucht oder in Glycerin eingebettet mit Deckgläsern und verkittet, so erscheint die graue Substanz gleichförmig von einer diffusen blauen Färbung durchtränkt, die sich an den den Nervenzellen entsprechenden Stellen schärfer hervorzuheben scheint. Die Trennungslinie zwischen grauer und weißer Substanz ist durch den Unter-

schied in der Farbe der beiden Substanzen deutlich abgegrenzt.

Charakteristischer ist die Differenzierung im Rückenmark und in der Medulla oblongata. Beobachtet man einen Rückenmarksschnitt bei schwacher Vergrößerung, so nimmt man wahr, daß anfangs eine leichte blaue Färbung am Innenrande der beiden Hinterhörner erscheint, die sich bis zur ganzen Lissauerschen Zone ausdehnt, dann erscheinen bläuliche Flecke, entsprechend den großen Zellen der Vorderhörner; nach und nach verbreitet sich die blaue Färbung um diese Stellen herum und ergreift die ganze graue Substanz, indem sie sie deutlich von der weißen Substanz abgrenzt, in der keine Stelle (weder Markscheiden noch Achsenzylinder oder Glia) die Farbe annimmt. Bei stärkerer Vergrößerung beobachtet man, daß, während in den anderen Teilen die blaue Färbung diffus ist, sie sich auf den Nervenzellen in elektiverer Weise auf ganz feinen Körnchen zu lokalisieren scheint, die das Zellprotoplasma besetzen und sich mehr um den Kern herum verdichten, indem sie um ihn herum einen augenfälligen blauen Hof bilden; der Kern bleibt undifferenziert, leicht blau gefärbt wie die Masse des Protoplasmas um die Körnchen herum. Ich habe blaue Körnchen in keinem anderen Teile außer in den motorischen Zellen des Markes und des Bulbus beobachtet; die kleinen Zellen der Seiten- und Hinterhörner, wie die Zellen der grauen Rindensubstanzen erscheinen gleichmäßig blau gefärbt, und dieses Blau ist intensiver als in den umstehenden Teilen. Es scheint also, daß bei der grauen Substanz ein — wahrscheinlich flüssiger — Stoff diffundiert ist, der sich bei der Synthese des Indophenols blau färbt, und daß außerdem im Protoplasma der Nervenzellen der Vorderhörner des Markes besondere Oxydasekörnchen vorhanden sind, die namentlich um den Kern herum angehäuft sind und die Farbe intensiver annehmen.

Tela chorioidea.

Ich habe Versuche mit der Indophenolsynthese an der Tela choroidea beim Frosch, Huhn, Meerschweinchen, Kaninchen, Rind, Hund und beim Menschen angestellt. Die Tela wurde sorgfältig auf Objektträgern ausgespannt, die mit der verdunsteten alkoholischen Lösung der beiden Stoffe präpariert

worden waren, und hierauf unter dem Mikroskop verfolgt; das Präparat wurde dann eventuell in Glycerin eingebettet. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle und um die Elemente zu differenzieren, Präparate mit der supravitalen Nilblaufärbung (gesättigte 1 %ige Brillantcresylblaulösung in physiol. Lösung, mit Sudan III, Neutralrot und Dämpfen von Osmiumsäure) hergestellt.

Ich will gleich erwähnen, daß die Tela chorioidea aller untersuchten Arten lebhaft auf die Oxydationssynthese des Indophenolblaus reagiert: ihre Epithelelemente, wie alle anderen Epithelien des Organismus, beginnen sich nach wenigen Minuten blau zu färben. Verfolgt man unter dem Mikroskop die Phasen der Färbung, so beobachtet man, daß sie sich nach einem allen untersuchten Arten gemeinsamen Typus vollzieht; die Epithelzapfen nehmen in ihrer Gesamtheit eine blaue Färbung an und treten deutlich auf dem farblosen Grund des umstehenden Binde- und Gefäßgewebes hervor (Tafel I, Fig. 1, Mikrophotographie, Tela chorioidea des Rindes, bei schwacher Vergrößerung: Ob. 4, ohne Okular).

Untersucht man nach 15 bis 20 Min. bei stärkerer Vergrößerung (bei Eintauchen der in Glycerin eingebetteten Präparate), so sieht man, daß jede Epithelzelle mit winzigen blauen Körnchen besät ist, die stärker an der Peripherie sind, wo sie einen intensiv gefärbten Ring bilden, der deutlich jede Zelle von der anderen abgrenzt (Tafel I, Fig. 2, Rind, $\frac{\text{Ok. 3}}{\text{Ob. 8}}$; Tafel II, Fig. 1, Meerschweinchen, $\frac{\text{Ok. 3}}{\text{Ob. 8}}$).

Beim Frosch, Huhn, Rind, Hund und beim Menschen färbt das Indophenolblau nur die beschriebenen Zellkörnchen; beim Meerschweinchen und Kaninchen dagegen färbt es außer ihnen auch andere Elemente. Beim Meerschweinchen nehmen in einem zweiten Zeitabschnitt, wenn die Zellkörnchen schon gefärbt sind, die großen kugelförmigen Anhäufungen von lipoider Substanz, die sich in besonderen Gebieten der Tela ansammeln, eine veilchenartige Färbung an, die allmählich immer intensiver wird. (Tafel II, Fig. 2, Meerschweinchen, $\frac{\text{Ok. 3}}{\text{Ob. 8}}$). Diese Färbung ist nicht durch eine oxydative Einwirkung der Fettkugeln bedingt, da sie ja erst spät eintritt, d. h. wenn das Indophenolblau sich

schon im Gewebe gebildet hat. Diese Kügelchen färben sich nämlich sofort violett, wenn sie mit Indophenol behandelt worden sind, und es ist anderseits bekannt (Herxheimer), daß das Indophenol ein Färbemittel für die Fette ist. Ihre violette Färbung inmitten der Tela chorioidea hängt also von der Annahme des Indophenolblaus ab, das sich in ihnen nun unter der Einwirkung des Zellfermentes und des Fermentes gebildet hat, das, wie wir sehen werden, in der Cerebrospinalflüssigkeit, von der die Drüse durchtränkt ist, enthalten ist.

Kugelförmige Fettmassen finden sich auch ausnahmsweise in der Tela chorioidea des Kaninchens, namentlich beim trächtigen Kaninchen, und nehmen gleichfalls violette Färbung an. Beim Kaninchen haben wir sodann eine neue Besonderheit, die das Aussehen seiner Tela chorioidea von dem aller anderen Arten unterscheidet. Beobachtet man bei schwacher Vergrößerung die Tela kurze Zeit nach ihrer Ausspannung auf dem Objektträger, so sieht man zahlreiche blaue Kügelchen längs der Linien der Epithelzapfen der Drüse so zerstreut, daß sie ihre Zellstruktur verdecken (Tafel III, Fig. 1, Kaninchen, Ob. 4, ohne Okular).

Bei stärkerer Vergrößerung $\left(\text{Tafel III, Fig. 2 } \frac{\text{Ok. 3}}{\text{Ob. 8}}\right)$ erscheinen diese Globula von kugelförmiger Gestalt, von verschiedener Größe, mit homogenem Inhalt.

Um mich hinsichtlich der morphologischen Bedeutung dieser Körnchen zu orientieren, untersuchte ich gleichzeitig mit Nilblau und mit Brillantcresylblau gefärbte Plexus chorioidei; alsdann ist es leicht, die vollkommene Übereinstimmung zu konstatieren, die sich bei dem Bild der vom Indophenol blau gefärbten kugelförmigen Globuli und den intra- und infrazellulären Globuli zeigt, die vom Brillantcresylblau hellblau mit intensiverem Saum gefärbt und deutlicher vom Nilblau unterschieden sind durch die gelbrötliche Färbung, die sie von jedem anderen Element des Gewebes differenziert. Diese kugelförmigen Tropfen erscheinen also als eine besondere Bildung der Tela chorioidea des Kaninchens — bei den anderen Arten konnte ich sie nicht beobachten — und die kleinsten sind innerhalb der Epithelzellen enthalten, während die größten zwischen den letzteren zerstreut sind; sie unterscheiden sich

deutlich von den sekretorischen Kugeln (Globoplasten Schläpfers, sekretorische Kugeln Pellizzis) der Drüsen selbst, die entfärbt und nur blau oder violett gefärbt an der Peripherie in den Nilblau und Brillantcresylblaupräparaten erscheinen, und von den kugelförmigen Fettanhäufungen, die sich unter Umständen darin vorfinden können und, wie schon bemerkt wurde, eine violette Färbung annehmen. Die kugelförmigen Tropfen der Tela chorioidea des Kaninchens, die die Indophenolreaktion so intensiv geben, enthalten unzweifelhaft das spezifische Ferment; infolge Erhitzens auf 80° während 30 Min. nehmen sie nämlich die Eigenschaft an, die Mischung zu synthetisieren, und auf dem Objektträger gehalten nehmen sie, wenn sie in Kohlensäure enthaltender Umgebung präpariert wurden, keine Färbung an, da die ganze Drüse farblos bleibt.

Außer den beschriebenen Tropfen reagieren die Epithelzellen der Drüse nach Verlauf einer kurzen Zeit auf die Indophenolsynthese, indem sie die schon bei den anderen untersuchten Arten beschriebenen, namentlich an der Peripherie dicht gedrängten feinen Körnchen zeigen; die Färbung dieser Körnchen vollzieht sich jedoch viel langsamer und bleibt blasser im Vergleich zur Färbung der beschriebenen intra- und infrazellulären Tropfen (Tafel III, Fig. 2).

In den Präparaten mit Sudan III nehmen diese letzteren Tropfen eine orangegelbe Färbung an, und eine bräunliche, wenn sie Dämpfen von Osmiumsäure ausgesetzt werden; mit Chloroform behandelt und hierauf der Indophenolreaktion unterzogen, reagieren sie sehr schwach; mit Nilblau, wie ich schon sagte, färben sie sich rötlich-gelb (das Nilblau färbt, wie durch die schönen Untersuchungen Kawamuras[1]) bekannt ist, die Glycerinester rot, die Cholesterinester und die Mischungen von Cholesterin und Fettsäuren in rötlicher Nuance, die sich sehr der von unseren Globuli angenommen Färbung nähert).

Aus der Gesamtheit dieser Reaktionen ergibt sich, daß die die Oxydasen enthaltenden intra- und extraglobulären Tropfen aus einer vorwiegend lipoiden Substanz (Gemisch aus Cholesterin und Fettsäuren?) bestehen, die ohne Zweifel Bedeutung für den Stoffwechsel der umstehenden Nervensubstanz besitzt.

Cerebrospinalflüssigkeit.

Cavazzani hat unter dem Namen Cerebro-Spinase ein in der Cerebrospinalflüssigkeit des Hundes und des Kalbes

[1]) R. Kawamura, Die Cholesterinesterverfettung. Jena 1911.

enthaltenes Ferment beschrieben, das die Eigenschaft zeigt, Guajactinktur, Pyrogallussäure, Galläpfelsäure, Hydrochinon und Orthotoluidin zu oxydieren: diese Merkmale würden das Ferment unter den Oxygenasen von Bach-Chodat einreihen lassen.

Da die anderen Versuche Cavazzanis[1]) über die Anwesenheit eines glykolytischen Fermentes in der Flüssigkeit nicht bestätigt worden sind [Panzer[2]), Lewandowsky[3])], und da die Anwesenheit einer Oxydase auch als eine sekundäre Verbreitung des Fermentes in der Flüssigkeit infolge Abtrennung von roten Blutkörperchen oder anderen eventuell ihr beigemischten Elementen erklärt werden kann, infolge eines technischen Mangels [Gerhartz[4])], so trug ich Sorge dafür, die besten experimentellen Bedingungen zu schaffen für das Aufsuchen der Oxydase, die infolge eines ähnlichen Prozesses wie der bei Cavazzanis Cerebro-Spinase eintretende die Indophenolreaktion ergab. Meine Untersuchungen beziehen sich vor allem auf Cerebrospinalflüssigkeit vom Menschen, von der man mittels der Quinckeschen Punktur leicht beträchtliche Mengen extrahieren kann, ohne daß Verunreinigungen vorkommen; einige Experimente wurden an der Flüssigkeit des Hundes wiederholt, die ich vermittels Punktur des Ligamentum atlanticum-occipitalis extrahiert hatte.

Nachdem einige Tropfen herausgekommen waren, wurde die Flüssigkeit in sterilem Reagensglas aufgefangen und lange Zeit mit der elektrischen Zentrifuge zentrifugiert, in Pipetten gefüllt und zur Reaktion in sterile Reagensgläser mit einer Mischung von 1%igem α-Naphthol und 0,30%igem Diamin in physiol. Lösung gebracht. Bei allen meinen Experimenten verwendete ich 1 ccm Flüssigkeit + 2 Tropfen einer jeden der beiden Lösungen. Ich verwendete bei ihnen vier Flüssigkeiten von Personen, die als physisch gesund betrachtet werden konnten (2 geheilte Alkoholisten und 2 Phrenastheniker); 8 Flüssigkeiten

[1]) E. Cavazzani, Weiteres über die Cerebrospinalflüssigkeit. Centralbl. f. Physiol. **10**, 145, 1896.

[2]) Th. Panzer, Zur Kenntnis der Cerebrospinalflüssigheit. Wiener klin. Wochenschr. **1899**, Heft 3.

[3]) M. Lewandowsky, Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. Zeitschr. f. klin. Med. **40**, 480, 1900.

[4]) H. Gerhartz, Chem. d. Lymphe, Handb. d. Biochem. **2**, Heft 7, S. 127.

von Epileptikern, von denen ich einige vor, andere nach dem Anfall entnahm; 5 Flüssigkeiten von Dementes praecoces; 5 Flüssigkeiten von progressiven Paralytikern. In allen diesen Fällen beginnt sich nach ungefähr 20 Min. (auch nach 10 Min, wenn sie in den Thermostaten bei 37° gebracht wurden) eine leichte blaue Färbung zu zeigen, die nach 30 bis 40 Min. deutlich blau und immer intensiver wird; die Kontrollgläser dagegen, die als Flüssigkeit physiol. Lösung enthalten, bleiben farblos und färben sich erst nach mehreren Stunden. Ich habe keine bemerkenswerten Unterschiede in der Zeit der Färbung der Flüssigkeiten gefunden; ich habe den Eindruck, als ob in den Fällen von Dementia praecox eine kurze Verzögerung in der Färbung eintritt; aber um dies zu bestätigen, müßten noch weitere Versuche angestellt werden.

Auch die Cerebrospinalflüssigkeit des Hundes reagiert unter denselben Bedingungen auf das Indophenol. Alle vorher gekochten Flüssigkeiten verhielten sich wie die Kontrollflüssigkeiten.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich also, daß in der Flüssigkeit ein oxydierendes Ferment vorhanden ist, das die Synthese des Indophenolblaus hervorruft und wahrscheinlich mit dem Ferment zu identifizieren ist, das Cavazzani schon unter dem Namen Cerebrospinase beschrieben hat.

Die Indophenol-Oxydase ist also im Zentralnervensystem reichlich vertreten, an bestimmten Stellen desselben und des Drüsengewebes der Tela chorioidea verteilt und in der Cerebrospinalflüssigkeit verbreitet. Da die letztere — wie die glaubwürdigsten Untersuchungen von Luschka zu beweisen bestrebt sind — eine Absonderung des Drüsengewebes der Chorioidea ist, so läßt sich annehmen, daß die in ihr enthaltene Oxydase von den in den Zellen der Drüse enthaltenen Fermentkörnchen herstammt, wie sich anderseits vermuten läßt, daß das in der ganzen grauen Substanz mit Ausnahme der in den Zellen der Vorderhörner enthaltenen Körnchen konstatierte, nicht an besondere Strukturen gebundene Ferment in einem durch das Gewebe verbreiteten flüssigen Mittel aufgelöst ist und direkt aus dem Ferment mit der Cerebrospinalflüssigkeit herstammt. Wenig Positives ist bis jetzt bekannt

über die Zirkulation der Cerebrospinalflüssigkeit im Zentralnervensystem und über die Rolle, die sie beim Stoffwechsel der Nervenelemente spielt. Viele Tatsachen bezeugen uns ohne Zweifel, daß sie sich aktiv an diesen Vorgängen beteiligt: die unmittelbaren funktionellen und anatomischen Veränderungen, die auf die Einführung von Giften oder Toxinen in die Subarachnoidalhöhle folgen, die rasche Erregbarkeit oder die rasche Anästhesie, die auf intrarachidiane Injektionen von speziellen Medikamenten folgt, die Verbreitung in der Flüssigkeit von Abbauprodukten des Nervengewebes — Cholin (Mott und Halliburton, Donatt), Cholesterin (Pighini), Phosphorsäure (Apelt und Schumm).

Man kann also annehmen, daß die Cerebrospinalflüssigkeit, indem sie um die Nerven- und Gliaelemente der grauen Substanz herum zirkuliert, auch die Oxydase dorthin trägt, die sie enthält, und inmitten dieses Gewebes reagiert, indem sie sich diffus blau färbt. Natürlich entsteht der Einwand, daß man eine gleiche Zirkulation auch bei der weißen Substanz annehmen könnte, die dagegen beim Reaktionsvorgang farblos bleibt: hier muß man notwendigerweise schließen, daß uns in dieser Hinsicht die fundamentalen anatomischen Kenntnisse fehlen, und daß wir mit Hilfe unserer einfachen Färbungsreaktion eine so wichtige Frage nicht entscheiden können.

Auf jeden Fall erscheint es uns von nicht gering anzuschlagendem Nutzen, daß wir konstatiert haben, daß nur in der grauen Substanz, d. h. in dem Teile des Zentralnervensystems, der seine wichtigsten Funktionen versorgt, ein oxydatives Ferment existiert, das darin gewiß eine wichtige Funktion versehen wird.

Die jüngsten Untersuchungen von S. Fränkel und seiner Mitarbeiter weisen darauf hin, daß bei den Vorgängen der Atmung des Gewebes, der Assimilation und der Auswahl des Materials aus dem Kreislauf der ungesättigten Phosphatide der Hirnsubstanz, deren wichtigster Repräsentant das Kephalin ist, großer Wert beizumessen ist. Für diese chemischen Bestandteile des Gehirns, die durch ihre große Gier nach Sauerstoff charakterisiert sind, wird ein oxydatives Ferment wie dasjenige, das Indophenol synthetisiert, wahrscheinlich eine wichtige Funktion versehen.

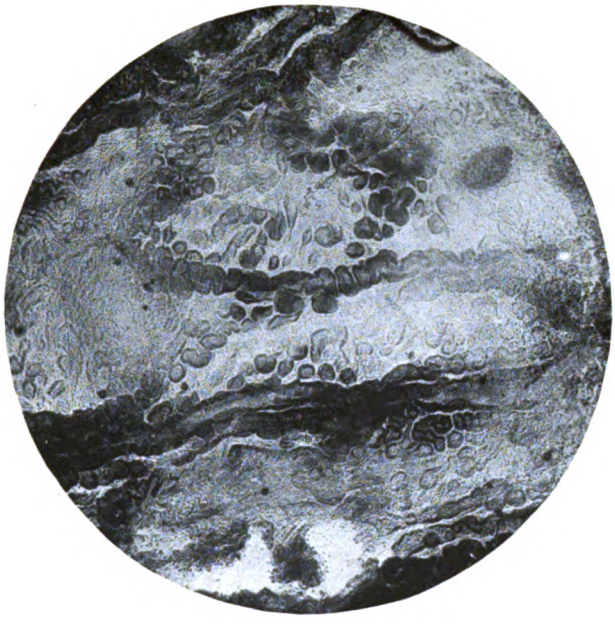


Fig. 1.

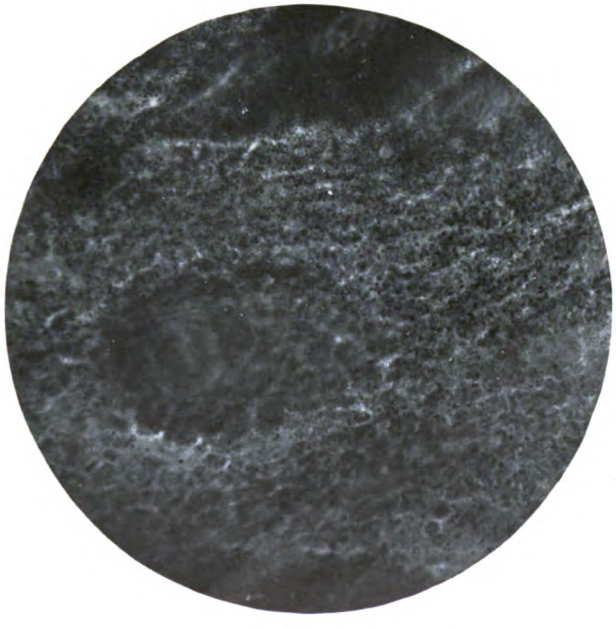


Fig. 2.

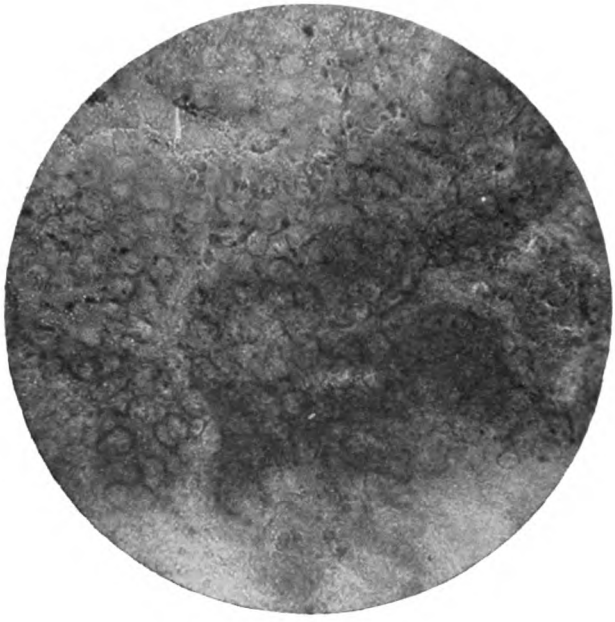


Fig. 1.

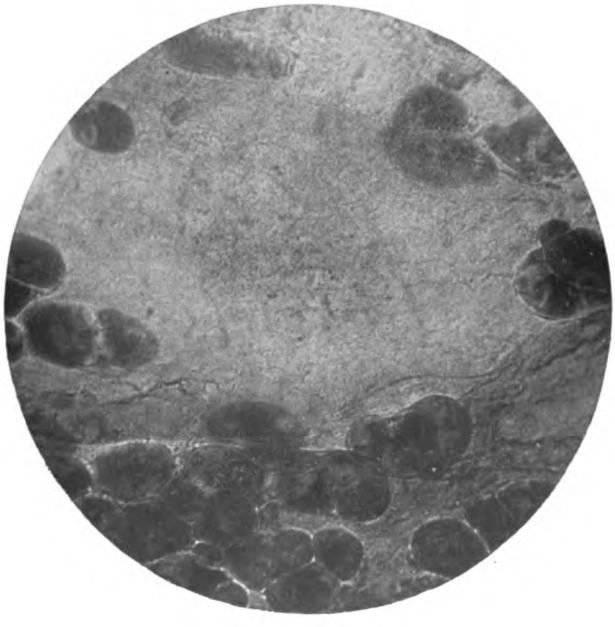


Fig. 2.

Fig. 1.

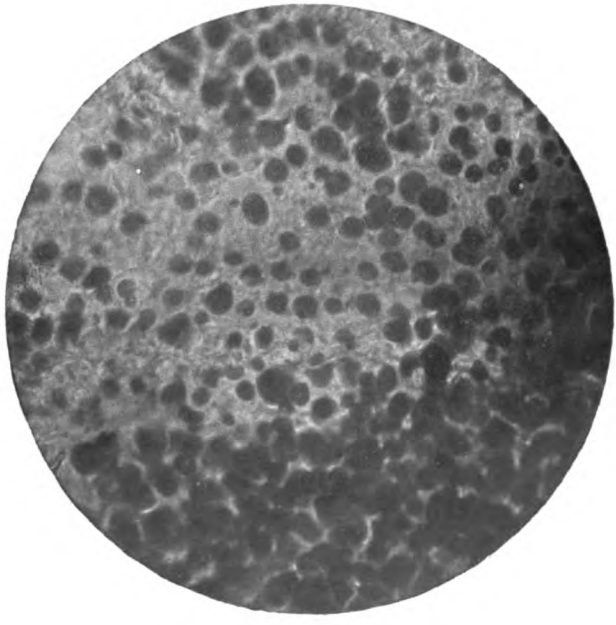


Fig. 2.

Chemische und biochemische Untersuchungen über das Nervensystem unter normalen und pathologischen Bedingungen.

Von

G. Pighini.

II. Mitteilung.

Untersuchungen über die Katalase im Liquor cerebrospinalis.

Von

Pietro Barbieri.

(Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium des Psychiatrischen Instituts in Reggio Emilia.)

(Eingegangen am 14. Mai 1912.)

Soviel ich weiß, wurde die Katalase noch nicht in der cerebrospinalen Flüssigkeit aufgesucht.

Von Cavazzani[1]) wurde, als er sich mit der Physiologie des Liquor cerebrospinalis beschäftigte, eine Oxydase aufgefunden, die er Cerebrospinase nannte; so wurde von Clerc und Garnier[2]) die Aufsuchung der Lipase, allerdings mit negativem Erfolge, unternommen; aber immerhin wurde bisher eine vollständige Arbeit über die Anwesenheit anderer Fermente in der erwähnten Flüssigkeit noch nicht veröffentlicht, und noch viel weniger eine über die Katalase. Die Aufsuchung der letzteren hielt ich aber für interessant, weil sie in fast allen bis jetzt studierten tierischen und pflanzlichen Geweben vorhanden ist, und weil zahlreiche Autoren ihre Menge haben feststellen können, die

---

[1]) E. Cavazzani, Contributo alla fisiologia del l. c. sp. Ferrara. Bresciani 1901.

[2]) Clerc et Garnier, Recherche de la lipase dans la l. c. rach. chez l'homme. Compt. rend. Soc. de Biol. 1909, Novembre.

je nach den verschiedenen Organen des tierischen Haushaltes mehr oder weniger veränderlich ist.

Die Katalase ist bekanntlich das Enzym, das die Eigenschaft hat H_2O_2 in Wasser und inaktiven, molekularen Sauerstoff O_2 zu zerlegen, im Gegensatz zu den Oxydasen, die dagegen aktiven, atomischen O aufnehmen.

Loew[1]) war es, der sie zuerst aus den Tabakblättern isolierte und ihren Namen vorschlug. Vor ihm hatte jedoch schon Schönbein[2]) in verschiedenen tierischen und pflanzlichen Geweben die Eigenschaft, das mit Sauerstoff verbundene Wasser zu katalysieren, entdeckt.

Schönbein und andere Autoren [Flügge[3]), Epstein[4]), Spitzer[5]) usw.] glaubten, daß diese Eigenschaft allen Fermenten gemeinsam wäre, und daß die Zerlegung durch dieselben Ursachen bedingt sei, die die Oxydationen der tierischen und pflanzlichen Gewebe veranlassen. Bei anderen Autoren dagegen [Abelous[6]), Lepinois[7])] überwog die Ansicht Loews, daß die Katalase ein spezielles Ferment mit spezifischer Wirkung sei, und daß sie in keiner Beziehung zu den gewöhnlichen Oxydationserscheinungen stehe: tatsächlich konnte Loew nachweisen, daß das wässerige Extrakt gewisser Tabaksorten in Anwesenheit von H_2O_2 eine energische Wirkung ergibt, ohne Guajactinktur hellblau zu färben. Auf jeden Fall haben die Unsicherheiten und Erörterungen bezüglich der Natur und Affinität der Katalase zu den Oxydasen noch nicht aufgehört, und während einige Autoren noch geneigt sind sie unter den Peroxydasen (indirekten Oxydasen) einzureihen, ist die Mehrzahl heutzutage der Ansicht, daß sie eine Gruppe für sich bilden, mit den Eigenschaften der zersetzenden Fermente. Der Stand der Frage wird sehr klar dargelegt von Carbone[8]) in einer synthetischen Übersicht über die Oxydasen und ihre praktischen Verwendungen, einer Arbeit, die alles zusammenfaßt, was über das wichtige Kapitel der Oxydasen bekannt ist und gesagt worden ist.

---

[1]) O. Loew, Catalase, a new enzym of general occurence with special reference to the tobacco plant. U. S. Department of Agriculture. Report Nr. 68, 1901.

[2]) F. Schönbein, Über die katalytische Wirksamkeit organischer Materien usw. Journ. f. prakt. Chem. 89, 323, 1863.

[3]) Flügge, Die Mikroorganismen 1, 213.

[4]) Epstein, Arch. f. Hygiene 36, 140.

[5]) W. Spitzer, Die Bedeutung gewisser Nucleoproteide für die oxydative Leistung der Zelle. Arch. f. d. ges. Physiol. 67, 615.

[6]) F. Abelous, Sur la présence dans l'organisme animal d'un ferment soluble décomposant l'eau oxygénée. Compt. rend. Soc. de Biol. 1899, 328.

[7]) E. Lepinois, Sur les ferments solubles décomposant l'eau oxygénée. Compt. rend. Soc. de Biol. 1899, 401.

[8]) D. Carbone, Le Ossidasi e le loro applicazioni pratiche. Biochimica e Terapia sperimentale, Anno I, fascic. 5, 1909.

So läßt sich auch über die physiologische und biologische Funktion der Katalase wenig sagen, weil sie wenig bekannt und wenig studiert worden ist. Bis jetzt möchte es nach den von einigen Forschern angestellten Untersuchungen scheinen, als habe sie keine andere Aufgabe als die das Wasserstoffsuperoxyd zu spalten, und auf welche Weise dies für den Organismus sich als nützlich erweist, weiß man nicht recht.

Wie dem auch sein mag, die Katalase hat eine ungeheure Verbreitung in der Natur. Man kann sagen, daß es fast keine tierische oder pflanzliche lebende Zelle gibt, die sie nicht absondert, und die Aufzählung aller Wesen und der Gewebe, in denen sie gefunden wurde, würde zu weitläufig sein.

Klassisch sind die Arbeiten von Battelli und Stern[1]) über die Verbreitung der Katalase in den tierischen Geweben. Diese Autoren konstatierten, daß der Reichtum an Katalase für jedes Gewebe bei allen erwachsenen Individuen derselben zoologischen Art konstant ist, und daß sie von Gewebe zu Gewebe variiert, aber je nach den verschiedenen Arten auf verschiedene Weise. Im allgemeinen ist das daran reichste Organ die Leber, dann die Niere, dann das Blut usw. Das an Katalase ärmste Organ soll das Gehirn sein, nach dem was schon Abelous beim Kalb und Rosenbaum[2]) in den Geweben des Rindes gefunden haben. Andere Autoren untersuchten das Verhalten der Katalase im Blute des normalen und auf verschiedene Weise erkrankten Menschen, unter ihnen Carrière[3]), Cotton[4]), Ville und Moitessier[5]), Senter[6]), Jolles und Oppenheim[7]), aber mit zum Teil einander widersprechenden Resultaten. Mehr übereinstimmende Ergebnisse zeigen sich dagegen bei den Autoren, die sie im normalen und pathologischen Harn aufsuchten [Carrière[8]), Vandervelden[9]), C. Ruggiero[10]), A. Prima-

[1]) F. Battelli et L. Stern, Recherches sur la catalase dans l'organisme animal. Arch. di Fisiol. 2, 471, 1905.

[2]) Rosenbaum, Beitrag zur Katalase des H_2O_2 durch Blut und Gewebe des Tierkörpers. Festschr. f. Solkowsky, 1904.

[3]) G. Carrière, Sur la présence d'oxydases indirectes dans les liquides normaux et pathologiques de l'homme. Compt. rend. Soc. de Biol. **41**, 561, 1899.

[4]) S. Cotton, Action de l'eau oxygénée sur le sang. Journ. de Pharm. et de Chim. **18**, 231, 1901.

[5]) S. Ville et J. Moitessier, Action du sang sur l'eau oxygénée. Compt. rend. Soc. de Biol. **1902**, 1051.

[6]) G. Senter, Das Wasserstoffsuperoxyd zersetzende Enzym des Blutes. Zeitschr. f. physikal. Chem. **46**, 257.

[7]) A. Jolles und Oppenheim, Beiträge zur Kenntnis der Blutfermente usw. Münch. med. Wochenschr. **1904**, Nr. 47.

[8]) Carrière, l. c.

[9]) Vandervelden, diese Zeitschr. **1907**, 403.

[10]) C. Ruggiero, Contributo allo studio della Catalasi. Medicina Italiana **1909**, Nr. 19.

vera[1])]. Keiner fand sie nämlich im normalen Harn, während alle sie im Harn der Nephritiker fanden. Ganz kürzlich hat Tschernoruzki[2]) die Katalase, zugleich mit anderen Fermenten, in den Extrakten von Leukocyten gefunden.

Für das Verhalten der Katalase bei Geisteskrankheiten hat sich, wie mir scheint, kein anderer außer Pighini[3]) interessiert. Er untersuchte nämlich die Katalase des Blutes bei mehreren Geisteskrankheiten und konstatierte, daß dessen katalytisches Vermögen fast immer vermindert ist, namentlich bei den mehr akzentuierten Formen und in den akuteren Stadien, und er kam zu dem Schlusse, daß im Kreislauf der verschiedenen studierten Kranken einstweilen noch unbekannte Bedingungen vorhanden sind, die so beschaffen sind, daß sie die Katalase in bezug auf ihre Geschwindigkeit bei Zerlegung des mit Sauerstoff verbundenen Wassers verändern.

Zur Vervollständigung des Studiums über die verschiedenen Fermente der cerebrospinalen Flüssigkeit, mit dem wir in unserem Laboratorium beschäftigt sind, unternahm ich es zu untersuchen, ob die Katalase auch in dieser Flüssigkeit vorhanden ist und wie sie sich bei den verschiedenen Geisteskrankheiten verhält.

Um die enzymatische Tätigkeit des Fermentes zu bestimmen, nahm ich die Titrierung des rückständigen Wasserstoffsuperoxyds mit Kaliumpermanganat vor. 20 ccm einer 0,30%igen (zuweilen 1%igen) Lösung von Wasserstoffsuperoxyd (Perhydrol Merck), die eine gewisse Zeit hindurch in einem Reagensglase im Thermostaten aufbewahrt wurden, setzte ich in einem bestimmten Augenblicke 2 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit zu, entnahm dann sogleich 5 ccm der Mischung und titrierte. Dann brachte ich das Reagensglas wieder in einen Ostwaldschen Thermostaten, der für bestimmte Temperaturen (meistens 38°, bisweilen aber 28°) eingerichtet war, entnahm ale 10 Min. 5 ccm der Flüssigkeit und titrierte; auf diese Weise macht man in einer halben Stunde vier Titrierungen. Diese werden mit dem Kaliumpermanganat bei verschiedenen Konzentrationen ($^n/_{50}$ bis $^n/_{100}$) in einer Schwefelsäurelösung (1 : 5)

---

[1]) A. Primavera. Riforma Medica **1906**, Nr. 46.

[2]) M. Tschernoruzki, Über die Fermente der Leukocyten. Zeitschr. f. physiol. Chem., November **1911**.

[3]) Pighini, La Catalasi del sangue in alcune malattie mentali. Annali di Neorologia, fascic. **5, 6**, 1906.

ausgeführt. Von der Zahl der bei der Titrierung verwendeten Kubikzentimeter der Kaliumpermanganatlösung wird die Menge des zerlegten Wasserstoffsuperoxyds abgezogen.

Da, wie schon aus den Untersuchungen Senters und Pighinis bekannt ist, die erwähnte Zerlegung nach dem Gesetze der monomolekularen Enzymreaktionen vor sich geht, kann man den Geschwindigkeitskoeffizienten der Reaktion herleiten aus der (auf Dezimalstellen von Logarithmen reduzierten) Formel

$$0{,}4343\, K_1 = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{c_1}{c_2},$$

worin c_1 und c_2 die bei zwei aufeinander folgenden Beobachtungen abgelesenen Konzentrationen von H_2O_2 repräsentieren, $t_2 - t_1$ die zwischen ihren verlaufene Zeit.

Die Versuche wurden von mir an 24 Insassen der Irrenanstalt zu Reggio Emilia ausgeführt; bei Vornahme der Lumbalpunktion trug ich stets Sorge dafür, daß ich die Flüssigkeit nicht nur aseptisch, sondern auch frei von jeder, auch minimalen Blutspur extrahierte; zudem wurde die Flüssigkeit, sobald sie extrahiert war, lange zentrifugiert. In einigen Fällen wurde parallel mit der Untersuchung der frischen Flüssigkeit die Untersuchung an der 10 Minuten lang gekochten Flüssigkeit vorgenommen.

Von den 24 der Untersuchung unterzogenen Kranken sind 5 Epileptiker, 5 progressive Paralytiker, 8 an Dementia praecox Leidende, wovon 6 im Stadium des Stupors und der Katatonie. Von zwei Fällen von manisch-depressivem Irresein betrifft einer ein seit langer Zeit deprimiertes und melancholisches Individuum, der andere einen Kranken im Stadium chronischer Erregung. Zwei Beobachtungen betreffen zwei Fälle von infantiler Cerebropathie mit Epilepsie.

Endlich wurden die beiden letzten Untersuchungen an Individuen, Ex-Alkoholisten, vorgenommen, die gegenwärtig sich einer sehr guten Geistesverfassung erfreuen, da die zuerst von ihnen dargebotenen Störungen sich gebessert haben und derart sind, daß sie beinahe als normal betrachtet werden können.

Hier folgen nun die Resultate meiner Versuche:

Epileptiker.

Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %) Frische Flüssigkeit	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %) Gekochte Flüssigkeit	Temp. °	Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %) Frische Flüssigkeit	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %) Gekochte Flüssigkeit	Temp. °
1	—	7,90	8,00		2	—	—	7,95	
B. Giuseppe	10′	7,85	7,85	38	A. Raffaele	10′	8,55	7,90	38
30 Jahre alt	20′	8,15	7,85		50 Jahre alt	20′	8,30	7,85	
	30′	8,10	8,00			30′	8,20	7,90	

Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °	Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °
3	—	9,40		4	—	17,20	
F. Angelo	10′	8,85	38	B. Decensio	10′	17,20	38
22 Jahre alt	20′	6,55[1])		33 Jahre alt	20′	17,20	
	—	—			30′	14,20	

Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °
5	—	21,40	
R. Gaetano	10′	22,00	28
20 Jahre alt	20′	21,80	
	30′	21,50	

Paralytiker.

Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °	Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °
6	—	9,30		8	—	13,20	
S. Geminiano	10′	9,35	38	Q. Cesare	10′	12,90	38
58 Jahre alt	20′	9,00		39 Jahre alt	20′	13,70	
	30′	9,05			30′	13,00	
6a	—	9,10		9	—	14,90	
S. Geminiano	10′	9,70	28	C. Luigi	10′	13,30	38
58 Jahre alt	20′	9,60		42 Jahre alt	20′	13,20	
	30′	9,70			30′	13,20	
7				10		Konzentr. H_2O_2 (1 %)	
T. Torquato	—	9,40	38	S. Giovanni	—	50,70	38
31 Jahre alt	10′	9,10		42 Jahre alt	10′	50,50	
	20′	8,95			20′	50,60	
	30′	8,95			30′	50,20	

[1]) Experiment abgebrochen.

An Dementia praecox Leidende.

Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)		Temp. °	Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °
11		Frische Flüssigk.	Gekochte Flüssigk.		15			
	—	15,60	—			—	19,20	
D. Umberto	10′	15,60	15,45	38	V. Primo	10′	19,50	28
23 Jahre alt	20′	15,60	15,40		20 Jahre alt	20′	19,40	
	30′	15,60	15,15			30′	19,40	
12		Frische Flüssigkeit			16			
	—	14,55				—	8,30	
P. Pompeo	10′	14,80		38	N. Aurelio	10′	8,90	28
25 Jahre alt	20′	14,60			24 Jahre alt	20′	8,50	
	30′	14,60				30′	8,40	
13		Frische Flüssigkeit			17		Konzentr. H_2O_2 (1 %)	
	—	13,40				—	55,70	
D. Amando	10′	—		38	Z. Giacomo	10′	55,65	38
29 Jahre alt	20′	13,40			49 Jahre alt	20′	55,65	
	30′	13,45				30′	55,80	
14					18		Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	
	—	9,0				—	17,60	
P. Alberto	10′	9,0		28	P. Luigi	10′	17,50	28
27 Jahre alt	20′	9,0			36 Jahre alt	20′	17,50	
	30′	9,0				30′	17,50	

Manisch-Depressive. Cerebropathiker.

Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °	Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °
19	—	8,25		21	—	15,70	
P. Giovanni	10′	8,25	38	M. Margherita	10′	15,50	28
43 Jahre alt	20′	8,30		30 Jahre alt	20′	15,60	
	30′	8,30			30′	15,60	
20	—	11,20		22	—	15,90	
M. Alberto	10′	10,20	28	G. Pia	10′	16,00	28
34 Jahre alt	20′	10,20		34 Jahre alt	20′	15,90	
	30′	10,20			30′	15,90	

Normale.

Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °	Name	t	Konzentr. H_2O_2 (0,30 %)	Temp. °
23	—	30,10		24	—	38,80	
B. Tito	10′	30,20			10′	39,50	
19 Jahre alt	20′	30,20	38	G. Giovanni	20′	39,50	38
	30′	30,20			30′	39,50	

Wie sich aus den vorstehenden Tabellen ergibt, hat der Umstand, daß bisweilen die technischen Einzelheiten geändert wurden, in keiner Hinsicht das allgemeine Ergebnis dieser Untersuchungen beeinflußt.

Betrachtet man nämlich sowohl die bei verschiedenen Temperaturen gemachten als auch die zuerst mit frischer, dann mit gekochter Flüssigkeit ausgeführten oder diejenigen, bei denen eine stärkere (1 %ige) H_2O_2-Lösung verwendet wurde, so bemerkt man bei allen oder beinahe allen einige Schwankungen im Konzentrationswerte von H_2O_2, aber es ist nicht möglich aus ihnen irgendein Gesetz herzuleiten oder auf eine konstante, progressive Abnahme der Konzentration von H_2O_2 zu schließen. Die erwähnten Schwankungen sind ohne Zweifel unvermeidlichen Irrtümern bei den Ursachen zuzuschreiben, und auch dort, wo sie (bei einem Epileptiker und bei einigen Paralytikern) auf eine Konzentrationsabnahme hinzudeuten scheinen, haben sie keinen absoluten Wert und genügen nicht, um uns die Anwesenheit eines katalysierenden Fermentes in dieser Flüssigkeit annehmen zu lassen.

Zusammenfassend läßt sich aus der Gesamtheit dieser Untersuchungen einstweilen folgern, daß im Liquor cerebrospinalis sowohl unter normalen Verhältnissen als unter den bis jetzt untersuchten Krankheitsbedingungen die Katalase nicht enthalten ist.

Chemische und biochemische Untersuchungen über das Nervensystem unter normalen und pathologischen Bedingungen.

Von

G. Pighini.

III. Mitteilung.

Aufsuchung der Esterase und der Lecithase in der normalen und pathologischen Cerebrospinalflüssigkeit.

Von

Flaminio Nizzi.

(Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium des Psychiatrischen Instituts in Reggio Emilia.)

(Eingegangen am 14. Mai 1912.)

Lipase wurde vergebens in der Cerebrospinalflüssigkeit gesucht von Clerc und Garnier[1]), den einzigen Autoren, so viel ich weiß, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben. Sie beschränkten ihre Untersuchungen auf Flüssigkeiten von normalen Individuen und von Kranken, die an verschiedenen Krankheiten, jedoch keine Geisteskrankheiten, litten.

Ich habe mir vorgenommen, indem ich die Reihe der Untersuchungen über die Fermente der Cerebrospinalflüssigkeit fortführe, zu untersuchen, ob in der Flüssigkeit von normalen Personen und von Geisteskranken esterasische Lipasen und für das Lecithin spezifische Lipasen vorhanden sind. Zu dieser letzteren Untersuchung bewog mich ganz besonders die noch ungeklärte Erscheinung, daß bei gewissen organischen Krankheiten des Zentralnervensystems (progressive Paralyse, Epilepsie) als abnormes Element in der Flüssigkeit Cholin gefunden werden kann, das bekanntlich ein Spaltungsprodukt des Lecithins ist, sowie Spuren von Lecithin selbst [Ziveri[2])].

[1]) Compt. rend. Soc. de Biol. Novembre 1909.

[2]) Modificazioni al metodo di ricerca della colina e nuove indagini sulla presenza di essa e di lecitina nel liquido cefalo-rachidiano. Rivista di Pat. nervosa e mentale 14, J. 1909.

Das Vorkommen von Esterasen und Lecithasen wurde in jüngster Zeit von Pighini[1]) im Blutserum von Geisteskranken studiert. Ich wiederholte seine Untersuchungen an der Cerebrospinalflüssigkeit von vielen derselben Kranken.

Für die Esterase habe ich außer dem Monobutyrin auch das Tributyrin verwendet, beide in 2,5 %iger Emulsion, in physiologischer Lösung mit Soda in Substanz neutralisiert. Für das Lecithin stellte ich jedesmal eine 1 %ige Lecithinemulsion in physiologischer Lösung her. Als Indicator verwendete ich Phenolphthalein.

Folgendes war das von mir angewendete Verfahren:

Die vorher in einer elektrischen Zentrifuge zentrifugierte Flüssigkeit wurde steril in Mengen von 1 ccm zugesetzt, um im Falle der Esterase auf 10 ccm Monobutyrin und Tributyrin zu wirken, oder auf 5 ccm der mit 3 ccm 4 %iger $MnSO_4$-Lösung gemischten Emulsinemulsion.

Die mit den oben beschriebenen Mengen versehenen Reagensgläser wurden hierauf in einen Ostwaldschen Thermostaten bei 38° gebracht. Nach Ablauf bestimmter Zeitabschnitte wurden die Schwankungen der Acidität der Flüssigkeit mit $^n/_{10}$-Natriumhydratlösung geprüft.

Um die Titrierung des Lecithins zu erleichtern, wurden 40 ccm 45 %igen Alkohol zugesetzt; als Indicator diente Phenolphthalein. Die Resultate meiner Untersuchungen sind in den folgenden Tabellen verzeichnet:

Tabelle I.
Epileptiker.

Name und Vorname	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	2,5 %ige Monobutyrinemulsion ccm	Gesamtacidität in $^n/_{10}$-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in $^n/_{10}$-NaOH
Ba. Adolfo	1	10	0	4	0
Bu. Giuseppe . . .	1	10	0	2	0
Am. Raffaele . . .	1	10	0,10	2	0,10
Mar. Umberto . .	1	10	0	3	0,10
Ben. Decenzio . .	1	10	0	4	0
Cam. Gaetano . .	1	10	0	3	0,10

[1]) Diese Zeitschr. **33**, 190, 1911.

Tabelle II.

Dementes praecoces.

Name und Vorname	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	2,5%ige Monobutyrinemulsion ccm	Gesamtacidität in $^n/_{10}$-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in $^n/_{10}$-NaOH
Zan. Giacomo . .	1	10	0	3	0
Pan. Pompeo . . .	1	10	0,20	2	0,20
Dar. Alberto . . .	1	10	0,10	2	0,20
Ber. Francesco . .	1	10	0	$3^1/_2$	0,10
Do. Armando . . .	1	10	0	3	0

Tabelle III.

Progressive Paralytiker.

Name und Vorname	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	2,5%ige Monobutyrinemulsion ccm	Gesamtacidität in $^n/_{10}$-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in $^n/_{10}$-NaOH
Ter. Torquato . .	1	10	0	4	0
Ci. Luigi	1	10	0	3	0
Qu. Cesare	1	10	0	3	0
San. Giovanni . .	1	10	0	4	0
Sac. Geminiano . .	1	10	0	4	0

Tabelle IV.

Name und Vorname	Krankheit	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	2,5%ige Tributyrinemulsion ccm	Gesamt-Acidität in $^n/_{10}$-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in $^n/_{10}$-NaOH
Ci. Luigi . .	Progress. Paralyse	1	10	0	2	0
Qu. Cesare .	Progress. Paralyse	1	10	0	2	0
San. Giovanni	Progress. Paralyse	1	10	0	4	0
Do. Armando	Dementia praecox	1	10	0	2	0
Zan. Giacomo	Dementia praecox	1	10	0	3	0
Ber. Franc. .	Dementia praecox	1	10	0,10	3	0,10
Ben. Decenzio	Epilepsie	1	10	0	4	0,10
Cam. Gaetano	Epilepsie	1	10	0	3	0,10

Tabelle V.
Normal.

Name und Vorname	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	2,5%ige Monobutyrinemulsion ccm	Gesamt-Acidität in n/10-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in n/10-NaOH
Gib. Giovanni . .	1	10	0,10	2	0,10
Fu. Roberto . . .	1	10	0	3	0
Bon. Tito	1	10	0,10	2	0,20

Tabelle VI.
Epileptiker.

Name und Vorname	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	1%ige Lecithinemulsion ccm	4%ige $MnSO_4$-Lösung ccm	Gesamt-Acidität in n/10-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in n/10-NaOH
Bar. Adolfo	1	5	3	1,10	4	1,10
Bur.Giuseppe	1	5	3	1,10	2	1,20
Am. Raffaele	1	5	3	1,10	2	1,20
Ben.Decenzio	1	5	3	1,20	4	1,10
Mar.Umberto	1	5	3	1,15	3	1,00
Cam.Gaetano	1	5	3	1,20	3	1,10

Tabelle VII.
Dementes praecoces.

Name und Vorname	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	1%ige Lecithinemulsion ccm	4%ige $MnSO_4$-Lösung ccm	Gesamt-Acidität in n/10-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in n/10-NaOH
Za. Giacomo	1	5	3	1,19	3	1,10
Pan. Pompeo	1	5	3	0,90	2	0,80
Dav. Alberto	1	5	3	1,10	2	1,20
Ber. Franc.	1	5	3	1,10	3	1,00
Do. Armando	1	5	3	1,25	3	1,10

Tabelle VIII.
Progressive Paralytiker.

Name und Vorname	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	1%ige Lecithinemulsion ccm	4%ige $MnSO_4$-Lösung ccm	Ges.-Acidität in n/10-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in n/10-NaOH
Terri Torquato . .	1	5	3	0,60	1 u. 1/2	0,50
SacchettiGeminiano	1	5	3	0,60	1 u. 1/2	0,50
Cioni Luigi	1	5	3	1,25	3	1,20
Tuorti Cesare . . .	1	5	3	1,25	3	1,10
Santini Giovanni .	1	5	3	1,25	3	1,10

Tabelle IX.
Normal.

Name und Vorname	Cerebrospinalflüssigkeit ccm	1%ige Lecithinemulsion ccm	4%ige $MnSO_4$-Lösung ccm	Gesamt-Acidität in $^n/_{10}$-NaOH	Bei 38° während Stunden	Acidität in $^n/_{10}$-NaOH
Gib. Giovanni	1	5	3	1	2	1
Fu. Roberto	1	5	3	1,10	3	1
Bon. Tito .	1	5	3	1	2	0,90

Aus den im obigen mitgeteilten Untersuchungen ergibt sich, daß die bei den Reaktionen zwischen Flüssigkeit und Mono- oder Tributyrin angetroffenen Aciditätsschwankungen auch nach 3 bis 4 Stunden meistens gleich Null sind. Bisweilen sind sehr leichte Schwankungen vorhanden, aber immer derart, daß sie als innerhalb der Grenzen der experimentellen Fehler liegend betrachtet werden müssen. Es läßt sich also der Schluß ziehen, daß sowohl in der Cerebrospinalflüssigkeit des gesunden Menschen als in der der Kranken, die an den hier untersuchten Geisteskrankheiten litten, keine für das Mono- und Tributyrin spezifischen Esterasen existieren, die dagegen im Blutserum vorhanden sind.

Dieselbe Schlußfolgerung muß aus den ebenfalls negativ ausgefallenen Untersuchungen über die Lecithase gezogen werden.

Zur physikalischen Chemie der Lipoide. I.

Beziehungen der Lipoide zu den Farbstoffen.

Von

Siegfried Loewe.

(Aus dem chemischen Laboratorium der psychiatrischen und Nervenklinik und dem physikalisch-chemischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 14. Mai 1912.)

Mit 14 Figuren im Text.

Trotzdem die Namengebung der Lipoide schon auf deren vorwiegend physikalisch-chemische Bedeutung anspielt und die Zusammenfassung aller dieser chemisch so verschiedenartigen Körper von vornherein bewußt nur aus physikalisch-chemischen Gründen stattfand, haben sich doch bisher nur wenige Untersuchungen systematisch mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Gruppe von Substanzen befaßt. Sieht man von dem Studium einzelner kolloidchemischer Fragen an den wässerigen Lipoidlösungen ab, deren Kolloidnatur nie zweifelhaft war, — Fragen, die sich mit der fortschreitenden Kenntnis der Eiweißlösungen nach dieser Seite hin in den letzten Jahren auch für die Lipoide immer mehr aufdrängten, — so kann man nicht nur als die wichtigsten, sondern fast auch als die einzigen Arbeiten, die die physikalische Chemie der Lipoide berühren, die ersten Untersuchungen bezeichnen, welche zu der Schaffung des Lipoidbegriffs geführt haben.

Auch an diesen ersten, für die meisten Gebiete der Biologie so folgenreichen Forschungen von Meyer[1]) und Overton[2]) muß zwischen einer rein physiko-chemischen und einer angewandt-biologischen Seite unterschieden werden. Die erstere befaßt sich mit dem Studium der Beziehungen zwischen den lipoiden Substanzen und einer großen Reihe organischer Stoffe und gelangt zu der Feststellung, daß die Lipoide jenen Substanzen gegenüber als organisches Lösungsmittel fungieren und daß jene sich zwischen Wasser und Lipoid nach Maßgabe des Henryschen Verteilungssatzes verteilen. Die biologische Anwendung geschieht einerseits in Hinsicht auf das bekanntermaßen lipoidreiche Nervensystem: die gefundene Lipoidlöslichkeit erweist sich als besonders ausgeprägt bei solchen Stoffen, die narkotische Wirkung besitzen, und es wird auf Grund der Feststellung einer Parallelität zwischen Lipoidlöslichkeit und Befähigung zum Narkotikum eine Theorie der Narkose aufgestellt. Andererseits findet sich ein Zusammenhang zwischen der Aufnahmemöglichkeit in die lebende Zelle überhaupt und der Löslichkeit im Lipoid; hieraus wird auf die Lipoidnatur der Zellmembran geschlossen. Wenn also auch die Eigenschaft der Lipoide als Lösungsmittel studiert wurde, so stand doch im Vordergrund der biologische Teil der Untersuchungen, eine Erscheinung, die sich auch bei den ferneren Untersuchungen findet. Auch bei diesen ist im Mittelpunkte immer das Interesse an Beschaffenheit und Funktion der Zellgrenzschicht, und nur aus diesem Gesichtspunkte werden physiko-chemische Eigenschaften der Lipoide, deren Beteiligung an der Bildung dieser Zellmembran in Diskussion steht, berührt. So zieht Traube[3]) eine kapillarchemische Frage in Erörterung, indem er die Parallelität zwischen der Fähigkeit der Stoffe, in die Zelle einzudringen, — ihrer diosmotischen Fähigkeit — und der durch sie bewirkten Oberflächenentspannung ihres wässerigen Lösungsmittels feststellt; und Czapek[4]) fährt auf dem so eingeschlagenen Wege fort und zeigt, daß die Plasmolyse durch alle schädigenden Substanzen genau bei derjenigen Konzentration eintrete, bei welcher die oberflächenspannungserniedrigende Kraft einen für alle plasmolysierenden Substanzen gleichen Grad besitzt.

---

[1]) H. Meyer, Zur Theorie der Alkoholnarkose I u. III. Arch. f. experim. Pathol. u. Therapie **42**, 109, 1899 u. **46**, 338, 1901. — F. Baum, dasselbe II, ebd. **42**, 119, 1899.

[2]) E. Overton, Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle usw., Vierteljschr. d. Naturf.-Ges. Zürich **44**, 119, 1899. — Ders., Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die Zelle, Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik **34**, 669, 1900. — Ders., Studien über die Narkose, Jena, G. Fischer, 1901.

[3]) J. Traube, Theorie der Osmose und Narkose. Arch. f. d. ges. Physiol. **105**, 541, 1904. — Ders., Der Oberflächendruck u. seine Bedeutung im Organismus. Ebd. **105**, 559, 1904. — Ders., Ber. d. Deutsch. physik. Ges. **1904**, 326.

[4]) F. Czapek, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **28**, 150, 1910. — Ders., ebd. S. 480. — Ders., Über eine Methode usw., Jena 1911.

Schon diese wenigen hier angeführten Untersuchungen sind nicht ganz in Übereinstimmung untereinander; dabei sind noch nicht einmal die verschiedenen Stützungs- und Widerlegungsversuche der Overtonschen [Nathansohn[1]), Höber[2]), Ruhland[3])] und Traubeschen [Führer u. Neubauer[4]), Jacques Loeb[5])] Theorie berücksichtigt.

Um so notwendiger erscheint es, zunächst einmal diese inzwischen besser bekannt gewordenen lipoiden Substanzen von den Gesichtspunkten der physikalischen Chemie aus eingehender zu studieren, die ja in der Zwischenzeit gleichfalls recht wesentliche Fortschritte zu verzeichnen hatte; ist uns doch z. B. die Capillarchemie, ein Gebiet, in das, wie wir bereits sahen, die Fragestellung bei den Lipoiden in letzter Zeit hineinzuspielen begonnen hat, erst in den allerletzten Jahren vertrauter geworden, in denen sie durch die Arbeiten Freundlichs Fundament und Aufbau zugleich erhalten hat.

Von entscheidender Bedeutung ist es für das Gelingen dieses Vorhabens gewesen, daß ich mich in meinen Absichten der liebenswürdigsten und unermüdlichsten Unterstützung von Herrn Professor Freundlich in allen Phasen der vorliegenden Arbeit erfreuen durfte.

Als erstes Arbeitsfeld auf dem Gebiete der physikalischen Chemie der Lipoide ergab sich von selbst die Frage nach den Beziehungen der Lipoide zu den organischen Lösungsmitteln und den Farbstoffen, beides Substanzgruppen, die bei der Fundierung der Anschauungen über die biologische und pharmakologische Aufgabe der Lipoide durch Meyer und Overton eine Hauptrolle spielten.

Die Farbstoffe insbesondere haben, wie sich im folgenden zeigen wird, eine doppelte Bedeutung, indem sich bei der Prüfung der physikalisch-chemischen Beziehungen der Lipoide zu ihnen gleichzeitig bei geeigneter Versuchsanordnung auch auf die Beziehung der Lipoide zu den organischen Lösungsmitteln weitgehende Schlüsse ziehen lassen. Es wird daher die Betrachtung der Lipoidfarbstoffbindung zum Ausgangspunkt gemacht, um so mehr, als dies auch chronologisch diejenige Frage

---

[1]) A. Nathansohn, Jahrb. f. wissensch. Bot. **39**, 607, 1904. — Ders., Stoffwechsel der Pflanzen, Leipzig 1910.

[2]) R. Höber, diese Zeitschr. **20**, 56, 1909. — Ders., Physikalische Chemie der Zelle, Leipzig 1911.

[3]) W. Ruhland, Jahrb. f. wissensch. Bot. **46**, 1, 1908. — Ders., diese Zeitschr. 22, 409, 1909.

[4]) H. Führer u. E. Neubauer, Centralbl. f. Physiol. **20**, 117, 1906. — Dies., Arch. f. experim. Pathol. u. Therapie **56**, 333, 1907.

[5]) Jacques Loeb, Chem. Konstitution u. physiol. Wirkung usw. Diese Zeitschr. **23**, 93, 1909.

war, welche sich aus früheren Untersuchungen über physikalisch-chemische Eigenschaften der Lipoide heraus zuerst zur Untersuchung aufdrängte.

Bei Untersuchungen über die Aufnahme des Tetanustoxins durch Hirnlipoide nämlich[1]) wurde die Beobachtung gemacht, daß es anscheinend für das Endergebnis gleichgültig war, ob man die lipoiden Stoffe in Substanz mit der wässerigen Tetanustoxinlösung zusammenbrachte, oder sie, in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst, mit der Toxinlösung in Berührung treten ließ. Eine echte chemische Bindung zwischen Lipoid und Toxin erwies sich bei der späteren Untersuchung[2]) als unwahrscheinlich; danach würde man nun bei der Aufnahme durch festes, mit der Toxinlösung verriebenes Toxin zunächst an eine Adsorption des Giftes, bei der Aufnahme durch die Chloroform- (bzw. Äther-, Benzol- usw.) Lösungen der Lipoide in erster Reihe an eine Lösung in diesem Lösungskomplex gedacht haben; da in beiden Fällen das Ergebnis das gleiche war, so mußten entweder die festen Lipoide in der gleichen Weise, wie dies für den Lösungskomplex Lipoid-Chloroform zunächst anzunehmen war, als Lösungsmittel für Tetanustoxin, in diesem Falle demnach als feste Lösungsmittel fungieren, oder aber es mußten die Lipoide auch innerhalb ihrer Lösungen — oder ihre Lösungen als solche — als Adsorbentien für Tetanustoxin dienen können. Diese Verhältnisse bei Tetanustoxin sind nun die gleichen wie bei den sog. Vitalfarbstoffen, welche ebenfalls einerseits von in Wasser suspendierten oder emulgierten Lipoiden „gespeichert" werden (Overton), andererseits aber auch in die Lösungen der Lipoide in organischen Lösungsmitteln (Olivenöl, Benzol, Xylol [Overton], Terpentinöl [Ruhland]) übergehen. Auch hier liegen im letztgenannten Falle die Dinge so, daß die organischen Lösungsmittel allein meist nicht das geringste Lösungsvermögen für die in dem Lösungskomplex Lipoid-Benzol (o. ä.) gut lösliche Substanz besitzen. Nur ist im Falle der Farbstoffe die oben für das Tetanotoxin erwähnte doppelte Möglichkeit nie in die Diskussion gezogen worden; die Speicherung durch das in der wässerigen Farbstofflösung verteilte Lipoid wurde als Sonderfall — und zwar als besonders lehrreicher Sonderfall — der „auswählenden Löslichkeit" der Lipoide angesehen. Zwar hat sich auch Overton selbst einen Augenblick bei dem Auffälligen seiner Deutung aufgehalten und sagt darüber folgendes:

„In den Lehrbüchern der theoretischen Chemie findet man meist die Angabe, daß, wenn man eine feste Verbindung A in einem Lösungsmittel L auflöst, das Lösungsvermögen von L für eine zweite feste Ver-

---

[1]) S. Loewe, Über die Bindung des Tetanustoxins. Diese Zeitschr. **33**, 225, 1911.

[2]) S. Loewe, Über die Bindung des Tetanustoxins II. Ebenda **34**, 495, 1911.

bindung B hierdurch nicht geändert wird, sofern die Verbindungen A und B nicht chemisch aufeinander wirken . . ."

Aber er umgeht die Schwierigkeit der Frage in einfacher Weise dadurch, daß er seine zu der ganzen Erörterung ihm den Anstoß gebenden Beobachtungen als den Gegenbeweis ansieht und fortfährt:

„Dieser Satz . . . stützt sich hauptsächlich auf Erfahrungen bei wässerigen Lösungsmitteln. Daß der Satz keine allgemeine Gültigkeit besitzt, beweisen die mannigfaltigen, oben angeführten Versuche über das Lösungsvermögen von Benzol, Terpentin usw. für die basischen Anilinfarben, nachdem man vorher in diesen Lösungsmitteln Cholesterin, Äthal, Thymol usw. aufgelöst hat, aufs deutlichste, und es wäre ein leichtes, zahlreiche weitere hierhergehörige Beispiele aufzuführen."

Er meint dann weiter, die Erscheinung genügend zu klären, wenn er die Lösungen der Lipoide im organischen Lösungsmittel als „ein gemischtes Lösungsmittel" auffaßt, „wie etwa ein Gemisch von Äthylalkohol und Äthyläther". Daß diese Erklärung ebensowenig ausreichend ist, wie diejenige, die Höber von der gleichen Erscheinung gibt, wenn er sagt, daß die Lipoide das Lösungsvermögen der organischen Lösungsmittel in der gleichen Weise erhöhen, wie die Elektrolyte das des Wassers für manche Stoffe herabsetzen, geht schon aus der Tatsache hervor, daß doch, von einer gewissen Grenze der Mengenverteilung der beiden Komponenten des „gemischten" Lösungsmittels ab zum mindesten, sich der negative Einfluß des organischen Lösungsmittels gegenüber der Lösefähigkeit des Lipoids zu erkennen geben müßte, in der gleichen Weise, wie, um bei dem Overtonschen Parallelbeispiel zu bleiben, doch auch der Äthyläther, in ausreichender Menge zugesetzt, das Lösevermögen des Äthylalkohols für einen alkohollöslichen, aber ätherunlöslichen Stoff sehr merklich herabsetzen muß.

Die Möglichkeit, die ganze Frage der Beziehungen zwischen Lipoid und Farbstoff eindeutig zu klären, bietet sich nun in dem Studium der Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme von dem Volumenverhältnis der angewandten Solventien und von der Konzentration der Solvenda bzw. Dispergenda, mit andern Worten, in der Aufnahme von Konzentrationskurven; fungiert in einem System: organische Lipoidlösung-wässerige Farbstofflösung das Lipoid als echtes Lösungsmittel für den Farbstoff, so muß der Henrysche Verteilungssatz statthaben, die Konzentrationskurve muß einen linearen Verlauf zeigen; besteht zudem noch ein echter Lösungskomplex zwischen Lipoid und organischem Lösungsmittel, so muß außerdem bei Anwesenheit eines solchen sich ein Einfluß von dessen Menge auf die Farbstoffaufnahme erkennen lassen.

Da bei einem solchen quantitativen Studium der einzelne Versuch naturgemäß wesentlich mehr Zeitaufwand beansprucht,

als der einzelne qualitative Lipoidfärbeversuch, wie ihn Overton oder Ruhland anstellte, so mußte selbstverständlich auf die Vielseitigkeit, in der Overton seine Versuche mit Hilfe zahlreicher Farbstoffe anstellte, ebensowohl Verzicht geleistet werden, wie auf die Möglichkeit, lückenlos die ganze Reihe der heute isolierbaren Lipoide durchzuprüfen. Es steht zu hoffen, daß durch die aus diesem Grunde notwendige Beschränkung die Ergebnisse der folgenden, demnach nur in Stichproben vorgenommenen Untersuchungen nicht wesentlich an Wert verlieren; es kann zu diesem Punkte darauf verwiesen werden, daß ja auch eine große Anzahl von für die gesamte physikalisch-chemische Chemie der Eiweißkörper wichtigen Erkenntnissen, wie z. B. die Erfahrungen über das Wesen des Vorganges der Hitzekoagulation [Chick u. Martin[1])], nur an einzelnen Repräsentanten gewonnen wurden, ohne dadurch irgend an Bedeutung einzubüßen.

Die Versuchsanordnung wurde so getroffen, daß die im organischen Lösungsmittel gelösten Lipoide mit der wässerigen Lösung des Farbstoffes über- (bzw. unter-)schichtet wurden. Die Gesichtspunkte für die weitere Methodik ergaben sich erst aus einer größeren Anzahl anfänglicher Fehlversuche. So entstehen z. B., wie dies besonders Baum für seine Versuche über die Aufnahme der Narkotika durch Olivenöl beschreibt, beim Schütteln der organischen Lipoidlösungen gegen Wasser oder wässerige Lösungen sehr haltbare Emulsionen von oft rahmartiger Konsistenz; diese sind nun nicht nur dadurch sehr störend, daß sich zuweilen auch durch stundenlanges Zentrifugieren nicht die geringste Menge klarer wässeriger Lösung wiedergewinnen läßt; vielmehr macht eine andere Überlegung es noch wesentlich rätlicher, sie zu vermeiden, daß nämlich durch das Vorhandensein feinstemulgierter Tröpfchen der heterogenen Phase ein ganz neuer und keineswegs gleichgültiger Faktor auftritt, nämlich die vergrößerte Grenzfläche der beiden Phasen (d. i. der wässerigen und der organischen Lösung), welche von sehr beträchtlichem Einfluß auf das Konzentrationsgleichgewicht zwischen ihnen sein kann; während nämlich bei

---

[1]) Ch. Chick u. C. J. Martin, On the Heat Coagulation of Proteins. Journ. of Physiol. **40**, 404, 1910 und **43**, 1, 1911.

vorsichtiger Übereinanderschichtung die Grenzfläche zu klein ist, als daß sich die Wirkung ihrer Spannung bemerkbar machen könnte, muß aus der außerordentlichen Grenzflächenentwicklung einer solchen feindispersen Emulsion die Möglichkeit zu einer so bedeutenden Adsorption der in der wässerigen Phase gelösten Substanz resultieren, daß unter Umständen der größere Teil der erzielten Konzentrationsverminderung auf das Wirken dieser Energie zurückgeführt werden muß, welche nur einer unbeabsichtigten Komplikation ihr Vorhandensein verdankt. Es wurde daher bald davon Abstand genommen, durch Schütteln ein rasches, aber nicht den Absichten entsprechendes Gleichgewicht zu erzielen. Vielmehr wurden die Lösungen sehr vorsichtig übereinandergeschichtet und dann unter Vermeidung jeder Erschütterung, welche zur Bildung einer größeren Emulsionsschicht zwischen den beiden Phasen hätte führen können, das Eintreten des Gleichgewichts mit Hilfe der durch Schütteln nicht beeinflußten Diffusion abgewartet, wozu freilich, wie sich zeigen wird, Zeiträume von einer ganz anderen Größenordnung als bei Schüttelversuchen nötig waren.

Eine weitere Schwierigkeit war die Frage der quantitativen Bestimmung des Farbstoffs. Es fand sich, daß die einfache colorimetrische Bestimmung so ungenau ausfiel, daß die Deutung der mit ihr erzielten Ergebnisse zu groben Irrtümern führte. Eine einwandfreie Versuchsmethodik vermittelten uns erst die Untersuchungen von Pelet und Garuti über die „volumetrische Bestimmung der Farbstoffe“[1]). Das Verfahren dieser Autoren beruht darauf, daß viele basischen Farbstoffe mit sauren unlösliche Lacke bilden nach der Gleichung:

$$MCl + M'Na = MM' + NaCl,$$

worin M das Radikal eines basischen und M′ das Radikal eines sauren Farbstoffes darstellt. Der Lack MM′ ist weniger löslich als die Farbstoffe und seine Löslichkeit wird durch die Anwesenheit des anorganischen Salzes noch mehr verringert. Durch geeignete Auswahl läßt sich fast für jeden Farbstoff zum mindesten ein solcher von entgegengesetzter Reaktion finden,

[1]) D. Pelet et V. Garuti, Dosage volumétrique des matières colorantes I. Bull. Soc. Vaud. des sc. nat. **43**, 1, 1907. — Dies., II. Mémoire, ebenda.

welcher mit ihm einen Lack von für die Titration ausreichender Unlöslichkeit bildet, und die Autoren haben in ihrer Publikation solche Farbstoffpaare in großer Zahl zusammengestellt.

Die Titration gestaltet sich dann in folgender Weise: zu der Lösung des zu titrierenden Farbstoffes läßt man aus einer Bürette die Lösung des mit ihm am besten reagierenden Farbstoffes allmählich hinzulaufen; gegen das Ende der Reaktion entnimmt man dem Reaktionsgemisch mit einem Glasstab Proben, die man auf ein Blatt Filtrierpapier tropft; während sich nun in der Mitte des von dem basischen Farbstoff gebildeten Farbflecks der präcipitierte Lack befindet, wird um den Fleck gegebenenfalls ein Saum auftreten, der stets aus dem überschüssigen sauren Farbstoff besteht; es kennzeichnet sich also das Ende der Reaktion durch das Auftreten bzw. Verschwinden dieses Saumes. Um den Umschlag möglichst scharf ablesen zu können, ist nach unseren Erfahrungen eine sorgfältige Auswahl des Filtrierpapiers notwendig, da der zur Ablesung erforderliche Farbsaum bei manchen Papieren zu gering, bei anderen mit zu großer Saugkraft zu breit und daher zu schwach gefärbt ausfällt. Nach Angabe der Autoren muß die Reaktion stets in wässeriger Lösung vor sich gehen, weiter muß die Verwendung von Alkohol vermieden werden, da dieser den Lack mehr oder weniger löst.

Was den Einfluß der Elektrolyte auf die Lackbildung angeht, so liegen dazu Untersuchungen von L. Pelet-Jolivet vor[1]); seinen Tabellen läßt sich entnehmen, daß die Bestimmung des Gehaltes der Farbstofflösungen „selbst bei Anwesenheit von Elektrolytmengen richtig ist, die im Mittel 0,2 ccm *n* auf 10 ccm Farblösung erreichten, d. h. noch bei 20 ccm normalem Elektrolyt auf das Liter". Unterschiede in dem Grade des Einflusses der einzelnen Elektrolyte bestehen, besonders werden die Fehler sehr beträchtlich, wenn der Elektrolyt den Farbstoff zu fällen beginnt. Jedenfalls ist nach Pelet-Jolivet festgestellt, „daß der Zusatz kleiner Elektrolytmengen die quantitative Bestimmung nicht beeinträchtigt". Diese Fest-

[1]) L. Pelet-Jolivet, Zur Theorie des Färbeprozesses. Dresden, Steinkopf, 1910.

stellung ist auch für unsere Zwecke wichtig, da ja die Lipoide häufig Elektrolyte enthalten, die sie aus ihrer Lösung im organischen Lösungsmittel an die wässerige Phase abgeben könnten, und da weiter die Möglichkeit nicht außer acht gelassen werden darf, daß bei der Farbstoffaufnahme aus der wässerigen Lösung eines Farbsalzes nur die Farbstoffkompenente aufgenommen wird; wenn dann auch meist der entgegengesetztgeladene Rest durch von der aufnehmenden Substanz abgegebene Radikale neutralisiert wird, so kann doch ein Teil frei in Lösung bleiben und dann die Reaktion ungünstig beeinflussen. Das Vorkommen solcher Erscheinungen ist gerade in jüngster Zeit für den Fall der Adsorption genugsam beschrieben worden [Freundlich, Pelet-Jolivet, Michaelis[1])]. So ist im besonderen für die hier interessierenden basischen Farbstoffe aus den Untersuchungen von Knecht[2]), Suida[3]) und Freundlich[4]) bekannt, daß sie, als Chlorhydrate angewendet, sich beim Färben als Basen auf der Faser fixieren, während die Salzsäure in der Färbeflüssigkeit verbleibt; und zwar kann diese Salzsäure in freiem Zustande vorhanden bleiben, doch ist sie in den dort geprüften Fällen meist mit von der Faser abgegebenen Produkten verbunden.

Da es sich vermutlich um eine Adsorptionsverbindung zwischen Farbbase und Farbsäure handelt, so besteht eine weitere Einschränkung der Methode darin, daß sie wahrscheinlich nicht für jede beliebige Konzentration verwendbar sein wird, wenn auch die Autoren die Abhängigkeit der Löslichkeit der Lacke von der Konzentration des gefällten oder des fällenden Farbstoffes nicht geprüft haben. Sie machen nur die Angabe, daß sie „im allgemeinen bei einer Konzentration von $1\,^0/_{00}$" gearbeitet haben; „indessen variierte die Konzentration zuweilen zwischen 0,5 und $2\,^0/_{00}$". Aus späteren Untersuchungen von Pelet-Jolivet[5]) geht allerdings hervor, daß er auch Konzentrationen bis zu $5\,^0/_{00}$ verwendet hat. An

[1]) H. Lachs und L. Michaelis, Kolloid-Zeitschr. **9**, 275, 1911.

[2]) E. Knecht, Chem.-Zeitg. **12**, 1173, 1888.

[3]) W. Suida, Zeitschr. f. Farbenindustrie **6**, 365, 1907.

[4]) H. Freundlich und W. Neumann, Zeitschr. f. physikal. Chem. **67**, 538, 1909.

[5]) L. Pelet-Jolivet, Arch. Soc. physic. Genève **1908**, 430.

dem Methylenblau, dem bei unseren Untersuchungen bevorzugten Farbstoff, haben wir mit Krystallponceau als Fällungsmittel die Verwertbarkeit der Methode innerhalb der Kon zentrationen von 0,2 bis 1,0 $^0/_{00}$ geprüft.

Es wurde eine wässerige Methylenblaulösung von 1,00 g pro Liter (= 0,00325 molar) in den 5 Verdünnungen: 5 : 5, 4 : 5, 3 : 5, 2 : 5, 1 : 5 mit einer 1 $^0/_{00}$igen wässerigen Krystallponceaulösung titriert. Das in der folgenden Tabelle I zusammengestellte Ergebnis zeigt eine befriedigende Übereinstimmung zwischen berechneten und gefundenen Werten. Für viel geringere Konzentrationen freilich erweist sich die Methode, wie sich weiter unten zeigen wird, schon wegen der zu hohen Fehlergrenze als unzulänglich. Die Untersuchung mußte sich daher im allgemeinen auf das Gebiet zwischen 0,2 und 2,0 (Gewichts-) $^0/_{00}$ beschränken. Es wird sich ergeben, daß diese Bewegungsfreiheit für den Zweck unserer Untersuchungen eine vollauf genügende war.

Tabelle I.

Verdünnung	Für 10 ccm Lösung verbrauchte ccm Krystallponceau	Konzentration der Methylenblaulösung Gramm pro Liter	
		gefunden	berechnet
5 : 5	7,83	1,00	1,00
4 : 5	6,35	0,81	0,80
3 : 5	4,89	0,62	0,60
2 : 5	3,33	0,42	0,40
1 : 5	1,59	0,20	0,20

Mit Hilfe der hiernach äußerst brauchbar erscheinenden Methode von Pelet und Garuti wurden nun die Beziehungen zwischen Lipoiden und Farbstoff geprüft. Wie bereits angedeutet, mußte sich die Untersuchung mit Stichproben begnügen, sowohl hinsichtlich der Zahl der untersuchten Lipoide, wie auch hinsichtlich der Zahl der Farbstoffe. Was die Lipoide angeht, so wird die sie betreffende Unvollständigkeit um so weniger ins Gewicht fallen, als die zur Untersuchung herangezogenen genügten, um die Typen aller bei dem zu prüfenden physikalisch-chemischen Vorgang vorkommenden Gesetzmäßigkeiten aufzustellen. Hinsichtlich der Farbstoffe wird sich erweisen, daß es eine Aufgabe für sich ist, die sämtlichen Glieder

der von Overton und Ruhland aufgestellten Farbstoffreihen gemäß den in der vorliegenden Untersuchung sich ergebenden Gesichtspunkten neuerlich auf ihre „Lipotropie“ zu prüfen; für den Hauptzweck der vorliegenden Arbeit jedenfalls schien es zu genügen, wenn das Methylenblau als der gebräuchlichste Repräsentant der basischen „Vital“farbstoffe in den Vordergrund der Untersuchung gestellt wurde.

Das benutzte Methylenblau war ein durch die chemische Fabrik Dr. Heinr. König & Co. bezogenes metallfreies, chemisch reines Methylenblau medicinale.

Zur Titration wurde unter den verschiedenen von Pelet und Garuti angegebenen Fällungsmitteln das Krystallponceau als besonders geeignet ausgewählt. Das verwendete Präparat stammte aus der Badischen Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen (Nr. 62 der „Übersicht der organischen Farbstoffe“ von Schultz und Julius).

1. Das Gleichgewicht in dem System: Chloroform—Kephalin = Methylenblau—Wasser.

A. Die Farbstoffkonzentration als unabhängige Variable.

Nach früher vielfach vorgenommenen qualitativen Färbeversuchen an den verschiedensten Lipoiden schien das Kephalin am intensivsten Methylenblau an sich reißen; es wurde daher für den ersten Versuch am geeignetsten gehalten. Als Präparat wurde ein nach der Methode von Parnas[1]) aus Gehirn gewonnenes, vielfach gereinigtes Kephalin von hellgelbbrauner Farbe verwendet. Seine Lösung in Chloroform bildete die eine („heterogene“) Phase, eine wässerige Lösung von Methylenblau die zweite („wässerige“) Phase des zu untersuchenden Systems. Aus den oben erörterten Gründen wurde das Eintreten des Gleichgewichtes nicht durch Schütteln der beiden Phasen beschleunigt, sondern beide vorsichtig übereinander geschichtet und möglichst vor Erschütterungen und Temperatureinflüssen geschützt, bis zur Erreichung des Gleichgewichtes stehen gelassen. Die zur Einstellung des Farbstoffgleichgewichtes nötige Zeit wurde in Versuch 1 durch Vergleich der an den verschiedenen Tagen gewonnenen Titrationsergebnisse ermittelt und ergibt sich aus Tabelle II.

---

[1]) J. Parnas, Über Kephalin. Diese Zeitschr. 22, 411, 1909.

Versuch 1.

Heterogene Phase: Je 0,4 g Kephalin in je 80 ccm Chloroform gelöst.

Wässerige Phase: Je 150 ccm Methylenblaulösung in 5 verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,63 und 3,66 millimol.

Versuchsdauer: 24 Tage.

Tabelle II.

Nummer	a millimol	Titrationsergebnis nach 3 Tagen $\frac{x}{m}$ millimol/g	3 Tagen c millimol	16 Tagen $\frac{x}{m}$ millimol/g	16 Tagen c millimol	24 Tagen $\frac{x}{m}$ millimol/g	24 Tagen c millimol
1	3,66	3,542	2,158	6,106	1,214	6,166	1,198
2	2,50	3,272	1,218	5,188	0,450	5,083	0,490
3	1,88	3,188	0,667	4,646	0,090	4,604	0,102
4	1,25	2,875	0,175	3,209	0,040	3,272	0,019
5	0,63	1,479	0,040	1,563	0,012	1,542	0,015

Tabelle III.

Nummer	$a - c$	$\frac{a-c}{c}$	$\frac{1}{n}$	k (für $\frac{1}{n} = 0{,}351$)
1	2,46	2,05	ber. aus 1 u. 2: 0,216	5,8
2	2,01	4,10	„ „ 2 „ 3: 0,631	5,1
3	1,78	17,45	„ „ 2 „ 4: 0,215	10,0
4	1,23	64,73	„ „ 4 „ 5: (1,59)	5,8
5	0,62	(51,68)		7,1
			Im Mittel: 0,351	6,8

Wird der Versuch so angesetzt, daß über die Kephalin-Chloroformlösung die wässerige Farbstofflösung vorsichtig in einem großen Erlenmeyer-Kolben zur Schaffung einer möglichst großen Berührungsfläche zwischen den beiden Phasen geschichtet wird, so vermeidet man das Auftreten einer Emulsion vollständig; erst nach einiger Zeit bildet sich allmählich eine schmale und unbedeutende Emulsionsschicht an der Grenze der beiden Phasen. Das Methylenblau sieht man nach dem Überschichten allmählich in die Chloroformphase eindringen, die nach 1 Stunde schon ganz mit Farbstoff durchsetzt ist. Freilich ist damit, wie die Tabelle II zeigt, das Gleichgewicht noch lange nicht erreicht. Vielmehr sind dazu selbst 3 Tage noch nicht entfernt hinreichend,

während allerdings zwischen dem 16. und 24. Tage eine wesentliche Veränderung nicht mehr vor sich geht.

Setzt man die ursprüngliche Konzentration des Methylenblau in der wässerigen Phase als a, die nach Eintritt des Gleichgewichtes dort vorhandene Methylenblaukonzentration als c, so müßte nach dem Henryschen Verteilungssatze die Beziehung $\frac{a-c}{c} = \text{konst.}$ gelten. Wie die in Tabelle III für diesen Quotienten berechneten Werte zeigen, trifft diese Konstanz des Verhältnisses zwischen durch die heterogene Phase aufgenommener und in der wässerigen Lösung zurückgebliebener Menge für den Fall der Methylenblauaufnahme durch Kephalin-Chloroform keineswegs zu, vielmehr steigen die $\frac{a-c}{c}$-Werte mit dem Grade der Verdünnung sehr beträchtlich. (Daß der Wert 5 nicht nur keine weitere Vermehrung, sondern sogar eine Abnahme zeigt, liegt daran, daß für diese Verdünnung die Pelet-Garutische Methode nicht mehr ausreicht; es müssen daher sowohl die in Tabelle II wie III unter 5 verzeichneten Werte als ungenau vernachlässigt werden, wie auch schon für die Konzentration 4 die Methode keine exakten Werte mehr liefert). Dementsprechend zeigt sich in der graphischen Darstellung die Konzentrationsabhängigkeit nicht als die lineare Kurve des Henry-Satzes, sondern als eine Kurve, die hauptsächlich an eine Adsorptionsisotherme denken läßt. Prüft man nun, inwieweit die Beziehungen zwischen den gefundenen $\frac{x}{m}$-Werten (d. h. von der heterogenen Phase aufgenommene Methylenblaumengen pro Gewichtseinheit Kephalin[1]) und den Endkonzentrationen des Methylen-

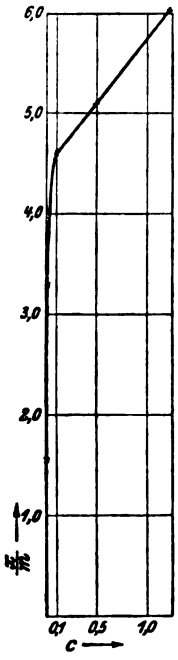


Fig. 1.

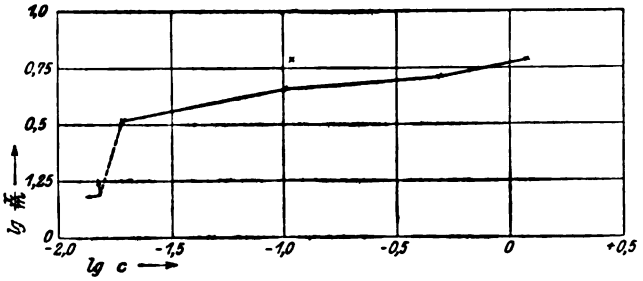


Fig. 2.

[1]) Mit welchem Rechte die Chloroformmenge vernachlässigt werden kann, wird sich später zeigen.

blau in der wässerigen Phase sich durch die Gleichung der Adsorptionsisotherme:

$$\frac{x}{m} = k c^{\frac{1}{n}}$$

ausdrücken lassen, so ergibt sich folgendes:

Die Werte für $\frac{1}{n}$ lassen sich aus den für je zwei Konzentrationen gefundenen Werten von $\frac{x}{m}$ bzw. $\frac{x'}{m}$ und c bzw. c' nach der Gleichung

$$\frac{1}{n} = \frac{\lg \frac{x}{m} - \lg \frac{x'}{m}}{\lg c - \lg c'}$$

berechnen. Wenn man von den so gefundenen vier Werten des Exponentialfaktors den aus den Konzentrationen 4 und 5 berechneten letzten Wert wegen der Unzulänglichkeit der Bestimmungsmethode für diese niedrigen Konzentrationen streicht, so findet sich (vgl. Spalte 4 der Tabelle III), daß der erste und dritte Wert, 0,216 und 0,215, sehr gut miteinander übereinstimmen, während freilich der zweite Wert, 0,631, ziemlich viel höher ausfällt. Immerhin liegen alle drei Werte (ja sogar auch der bereits ausgeschaltete vierte Wert, 1,59) noch innerhalb der Grenzen, in denen der Exponentialfaktor der Adsorptionsisothermen sich zu bewegen pflegt; denn er schwankt im allgemeinen[1]) zwischen 0,1 und 0,7; indessen sind gerade für Farbstoffadsorptionen auch Werte von $\frac{1}{n}$ über 1,0 beobachtet worden[2]).

Setzt man nun das Mittel aus den drei ersten $\frac{1}{n}$-Werten in die Adsorptionsgleichung ein, so berechnen sich für die fünf geprüften Konzentrationen die in der letzten Spalte von Tabelle III verzeichneten Werte für die Konstante k der Adsorptionsgleichung, die in der Tat eine ziemlich gute Übereinstimmung zeigen.

Es ergibt sich also, daß die „auswählende Löslichkeit" des Kephalins, des best„lösenden" Lipoides, für Methylenblau nicht dem Henryschen Absorptionsgesetze, sondern einer Adsorptionsgleichung folgt, und zwar zunächst in dem Falle, daß das Lipoid sich in einem organischen Lösungsmittel dispergiert findet. Mit anderen Worten, es liefert die Phase Kephalin-Chloroform eine, sich mit Methylenblau aus wässeriger Lösung absättigende Oberfläche. Überträgt man die hier gehandhabte

---

[1]) H. Freundlich und Losev, Zeitschr. f. physikal. Chem. 59, 284, 1907.

[2]) H. Freundlich, Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 385, 1907.

Versuchsanordnung auf das gleiche System unter Fortlassung des Chloroforms, d. h. auf eine Suspension von Kephalin in wässeriger Methylenblaulösung — in einem solchen System hatte Overton bei Benutzung der gleichen Lipoide, die er in dem System Öl-Lipoid/Wasserfarbstoff speichernd gefunden hatte, stets dasselbe Verhalten des Lipoids beobachtet, wie nach dessen „Lösung" im organischen Lösungsmittel —, so ist von vornherein anzunehmen, daß hier das Aufnahmevermögen des festen Lipoides dann eigentlich noch weniger auf einem Lösungsvorgang beruhen kann, als wenn es sich in einem wirklich flüssigen Lösungskomplexe befindet. Es ist für eine solche Suspension die Adsorption noch wahrscheinlicher. Und es wird durch diese Überlegung schon die Annahme nahegelegt, daß die Anwesenheit des organischen Lösungsmittels für die Reaktion zwischen Kephalin und Farbstoff ziemlich gleichgültig ist, was dann ohne weiteres zu der Vermutung führen wird, daß die Dispersion des Lipoids in diesem sein Verhalten so wenig beeinflussenden Dispersionsmittel eine kolloide ist. Geprüft kann diese Frage dadurch werden, daß man den Einfluß verschiedener Konzentration des Lipoides im Chloroform auf die Farbstoffaufnahme durch das Lipoid bestimmt.

B. Das Chloroformvolumen als unabhängige Variable.

Es wurden zu diesem Zwecke bei gleichbleibenden Volumen- und Konzentrationsverhältnissen der wässerigen Methylenblaulösung und bei gleichbleibender absoluter Menge des Kephalins ausschließlich die Mengen des Chloroforms variiert.

Versuch 2.

Heterogene Phase: Je 0,4 g Kephalin, gelöst in drei verschiedenen Volumina Chloroform.

Wässerige Phase: Je 100 ccm Methylenblaulösung, 3,66 millimolar.

Versuchsdauer: 23 Tage.

Tabelle IV.

Nummer	Chloroformvolumen ccm	Titrationsergebnis nach 2 Tagen $\frac{x}{m}$	2 Tagen c	15 Tagen $\frac{x}{m}$	15 Tagen c	23 Tagen $\frac{x}{m}$	23 Tagen c
1	50	1,969	3,128	6,595	1,901	7,781	1,581
2	100	2,062	3,105	5,750	2,122	8,064	1,503
3	200	1,907	3,150	6,501	1,923	7,812	1,572

Es bildet dieser Versuch zunächst einmal nebenher, da die Titrationen hier zu anderen Zeiten als bei dem ersten Versuch vorgenommen worden sind, eine Ergänzung zu der Ermittlung der Reaktionszeit zwischen Lipoid und Farbstoff; man sieht, daß, während die Titration am 16. Tage im vorhergehenden Versuch keinen wesentlichen Unterschied gegenüber am 24. Tage zeigte, der 15. Tag sich hier noch recht wesentlich vom 23. unterscheidet, so daß man die Reaktionszeit doch auf mindestens 16 Tage einschätzen muß.

Das Hauptergebnis des Versuches ist die Feststellung, daß die Reaktion zwischen Kephalin und Farbstoff in der Tat vollkommen unabhängig von der vorhandenen Menge des heterogenen Lösungsmittels ist. Denn $\frac{x}{m}$ ist trotz der großen Verschiedenheit des Chloroformvolumens (50, 100 und 200 ccm) in allen drei Einzelversuchen konstant geblieben (vgl. Fig. 5, S. 167). Der einfachste Weg, auf dem diese auffällige Tatsache erklärt werden kann, ist, wie bereits angedeutet, die Annahme, daß das Kephalin nicht in engeren Beziehungen, also nicht in Lösungsbeziehungen, zu dem Chloroform steht, sondern daß die Dispersion des Kephalins im Chloroform eine kolloide ist.

In der Einleitung ist bereits darauf hingewiesen, daß die in diesen Versuchen geübte Versuchsanordnung zur Prüfung der Beziehungen zwischen Lipoiden und Farbstoffen, nämlich die Untersuchung in einem zweiphasigen System mit einem organischen Lösungsmittel als Dispersionsmittel in der heterogenen Phase, zugleich imstande ist, Licht auf die Beziehungen des Lipoides zu diesem heterogenen Dispersionsmittel zu werfen; nunmehr leuchtet die Berechtigung dieser Aufstellung ein. Denn unsere beiden Versuchen führen, jeder für sich schon, und daher beide zusammen mit besonderer Beweiskraft, zu einem Aufschluß über diese Beziehungen; wird schon im ersten Versuche aus dem Befund, daß in Chloroform dispergiertes Kephalin Methylenblau aus wässeriger Lösung durch Adsorption aufnimmt, die Forderung erwachsen, daß das Adsorbens in Form von mit einer adsorptionsfähigen Oberfläche versehenen Teilchen vorhanden sei, so ersteht unabhängig davon die gleiche Forderung der Inhomogenität der Chloroformphase in sich in dem zweiten Versuch aus dem Befund der Unabhängigkeit der Farbstoffaufnahme des Lipoides von seinem Dispersionsmittel; so wird schon auf diese Weise die kolloide Natur der organischen Lipoidlösungen ziemlich sicher bewiesen.

2. Das Gleichgewicht in dem System: Cholesterin = Chloroform/Methylenblau = Wasser.

Das verwendete Cholesterin war teils ein aus Gehirn gewonnenes, vielfach gereinigtes Präparat eigener Herstellung, teils stammte es von Merck-Darmstadt. Das Prinzip der Versuchsanordnung war das gleiche wie bisher.

A. Die Farbstoffkonzentration als unabhängige Variable.

Versuch 3.

Heterogene Phase: Je 0,9 g Cholesterin in je 150 ccm Chloroform gelöst.

Wässerige Phase: Je 150 ccm wässeriger Methylenblaulösung in drei verschiedenen Konzentrationen.

Versuchsdauer: 38 Tage.

Tabelle V.

Nummer	a	$\frac{x}{m}$	c	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k (für $\frac{1}{n} = 0{,}454$)	k (für $\frac{1}{n} = 1{,}17$)
1	3,203	0,0511	3,157	0,016	0,454	0,0303	0,0133
2	2,135	0,0411	2,098	0,020	1,885	0,0294	0,0173
3	1,067	0,0111	1,057	0,010		0,0108	0,0104
			Im Mittel:		1,169	0,0235	0,0137

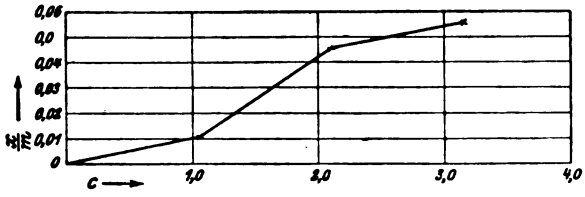


Fig. 3.

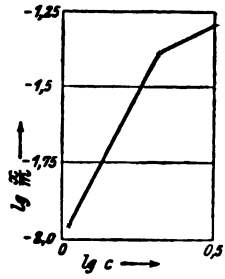


Fig. 4.

B. Das heterogene Lösungsmittel als unabhängige Variable.

Versuch 4.

Wässerige Phase: Je 150 ccm wässerige Methylenblaulösung, 1,067 millimolar.

Heterogene Phase: Je 1,5 g Cholesterin, in drei verschiedenen Volumina Chloroform gelöst.

Versuchsdauer: 32 Tage.

Tabelle VI.

Nr.	Chloroformvolumen ccm	a	$\frac{x}{m}$	c
1	20	1,067	0,0027	1,063
2	100	1,067	0,0187	1,039
3	400	1,067	0,0280	1,025

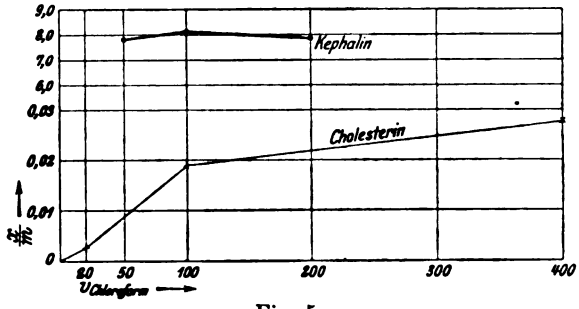


Fig. 5.

Das wichtigste und sicherste Ergebnis dieser Cholesterinversuche ist die Feststellung der äußerst schlechten Färbbarkeit des Cholesterins mit Methylenblau; eine Tatsache, die uns bereits seit langem bekannt war. Um so überraschender war es daher für uns, als sich später bei Overton die Färbbarkeit des Cholesterins betont und als Beweismittel seiner Theorie verwendet fand, und von Ruhland diese Angabe so weitgehend verwertet wurde, daß er praktisch Cholesterin„löslichkeit" und Lipoid„löslichkeit" häufig gleichsetzt. Nun besteht freilich zwischen den obigen Versuchen und denen Overtons ein wesentlicher technischer Unterschied. Overton arbeitete nicht mit Chloroformlösungen des Cholesterins, sondern mit geschmolzenem oder in Öl gelöstem Cholesterin, im einen Falle also bei einer Temperatur von mindestens 145°, im anderen bei 70°, während die vorliegenden Versuche bei Zimmertemperatur angestellt sind. Es wäre also immerhin denkbar, daß die Verschiedenheit des Ergebnisses sich aus einem hohen Temperaturkoeffizienten der Reaktion zwischen Farbstoff und Cholesterin erklärte. Eine zweite Erklärung böte die Annahme eines verschiedenen Dispersitätsgrades des Cholesterins, wie er auf S. 169 erörtert werden wird.

Es läßt sich außerdem folgendes feststellen:

Die Farbstoffaufnahme durch die Cholesterinphase ist so gering, daß die genaue Bestimmung der Werte mit den methodischen Fehlermöglichkeiten kollidiert. Dies gilt zunächst schon für die Werte der Konstanten k, die das Maß der Aufnahmefähigkeit darstellt. Immerhin wird aber, auch wenn wir nur deren Größenordnung berücksichtigen, der große Unterschied zwischen der Färbbarkeit des Cholesterins — mit einer Konstante von etwa 0,02 — und der in der vorausgehenden Versuchsreihe bestimmten des Kephalins, dessen k sich auf annähernd 7 beläuft, klar.

Viel weniger Genaues läßt sich über den zugrundeliegenden physikalisch chemischen Vorgang — ob Adsorption oder Verteilung — aussagen. Geringgradigkeit der Farbstoffaufnahme äußert sich im Diagramm als Abszissennähe der ganzen Kurve. Nun ist schon eine sichere, aber niedrige parabolische Kurve nur wenig von einer linearen Kurve mit kleinem Richtungsfaktor verschieden; um so weniger definierbar ist die vorliegende $\frac{d\frac{x}{m}}{dc_{Mbl.}}$-Kurve, wo die Genauigkeit der Messung der einzelnen Punkte noch unter der Fehlerbreite der Methode leidet.

Von Bedeutung für die Entscheidung dieser Frage ist nun der Versuch 4, in dem die Chloroformmenge variiert wurde. Mag er auch vielleicht aus dem gleichen Grunde wie der Versuch 3 quantitativ wenig Sicheres bieten, so zeigt er doch qualitativ wenigstens, daß das Mengenverhältnis zwischen Cholesterin und Chloroform nicht, wie bei dem Kephalin, gleichgültig für den Grad der Farbstoffaufnahme ist.

Zum Teil mag dies freilich davon herrühren, daß das von uns verwendete Methylenblau nicht ganz unlöslich in Chloroform ist. Doch ist die auf diesem Wege durch Verteilung aufgenommene Menge wohl zu gering, als daß sie sich bei der angewandten Bestimmungsmethode überhaupt geltend machte.

Danach kann man als sicher annehmen, daß der Vorgang keine ausschließliche Adsorption durch kolloid-disperse, innerhalb der Chloroformphase ohne engere Lösungsbeziehungen zu dieser verteilte Teilchen ist. Es dürfte also bei der, wie nochmals hervorgehoben werden muß, im ganzen bemerkenswerterweise geringen Methylenblau-Aufnahme durch Cholesterin im Vordergrunde im

Gegensatze zu den anderen in Verlauf dieser Untersuchungen geprüften Lipoiden ein Verteilungsvorgang stehen, zu dem sich anscheinend noch eine geringe Adsorption durch die vorhandenen, nicht molekular aufgelösten, sondern kolloid-dispersen Teilchen von Cholesterin hinzugesellt. Mit zunehmender Verdünnung nimmt die Zahl der kolloiden Cholesterinteilchen ab, ebenso wie dies für die wässerigen Seifenlösungen bekannt ist; gleichzeitig nimmt, im Gegensatz zu dem Thymol (vgl. S. 178ff.), auch die Farbstoffaufnahme zu; es ist also vermutlich das Cholesterin in seiner chloroformigen Lösung ein Semikolloid — und zwar mit ziemlich starker Tendenz zur molekularen Auflösung —, dessen Färbbarkeit gleichsinnig mit seinem Dispersitätsgrad steigt.

3. Das Gleichgewicht in dem System: Cerebrosid=Chloroform—Methylenblau=Wasser.

Als mit Methylenblau gut färbbares Lipoid wurde von Overton wie auch von späteren Untersuchern stets neben dem „Lecithin" auch das „Protagon" genannt. Einen wesentlichen Anteil des mit diesem Namen bezeichneten Lipoidgemisches machen die Cerebroside aus; es erschien daher zweckmäßig, auch Substanzen aus dieser Gruppe der Lipoide auf die Art des Bindungsvorganges genauer zu prüfen. Als Präparat wurde ein Cerebrosid verwendet, das auf folgende Weise gewonnen war:

Der Verdampfungsrückstand eines von Kephalin befreiten Gehirnextraktes wurde mit kochendem Alkohol behandelt. Der aus der heißen alkoholischen Lösung beim Erkalten ausfallende Teil wurde mit heißem Aceton ausgezogen und der in heißem Aceton unlösliche Rückstand mit Chloroform extrahiert; die hieraus in Sphärokrystallen sich allmählich abscheidende Substanz, die nur noch sehr geringe Mengen von Phosphor enthielt, wurde zur Anstellung der folgenden Versuche herangezogen; sie wurde vor allem deswegen gewählt, weil sie unter den verfügbaren Vorräten an reinen und Rohcerebrosiden das in größter Menge vorhandene Präparat ausmachte. Ein wirklich reines Thierfeldersches Cerebron[1]) war leider in der zu den Versuchen erforderlichen Menge nicht vorhanden und wäre wohl

[1]) Thierfelder, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 21, 1904/05; **44**, 366, 1905; **49**, 286, 1906.

auch, besonders in Anbetracht des Umstandes, daß eine absolute Reinheit bei den vorliegenden Versuchen ja gar keine ausschlaggebende Rolle spielt, zu kostbar gewesen, um es in Mengen von mehreren Gramm durch den, wie später noch gezeigt werden wird, unauswaschbaren Farbstoff unbrauchbar zu machen.

Versuch 5.

Heterogene Phase: Je 100 ccm einer Lösung von 0,29 g; Cerebrosid in 1 l Chloroform; wässerige Phase: Methylenblaulösung in 3 verschiedenen Konzentrationen.

Versuchsdauer: 16 Tage.

Tabelle VII.

Nummer	a millimol	$\frac{x}{m}$ $\frac{\text{millimol}}{g}$	c millimol	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k $\left(\text{für } \frac{1}{n} = 0{,}16\right)$
1	6,250	2,140	5,633	0,38		1,62
2	3,125	1,845	2,590	0,71	aus 1 u. 2: 0,19	1,59
3	1,563	1,723	1,063	1,62	aus 1 u. 3: 0,13	1,71
					Im Mittel: 0,16	1,64

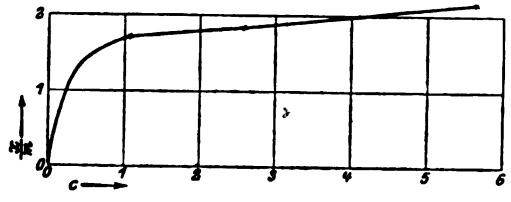


Fig. 6.

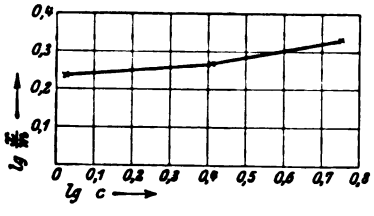


Fig. 7.

Die Cerebroside sind in reinem Zustande in kaltem Chloroform sehr schlecht löslich; das verwendete Rohcerebrosid verteilte sich jedoch, wie das gewöhnlich der Fall zu sein pflegt,

unter dem Einfluß der Anwesenheit kleiner Mengen von Phosphatiden befriedigend in Chloroform; doch war die Lösung trübe und opalescent. Es war also von vornherein mit einem kolloiden Dispersitätsgrad zu rechnen. Damit war aber das Ergebnis des Versuchs noch nicht eindeutig vorausbestimmt. Es wäre immer noch möglich gewesen — und ein solches Resultat wäre sogar recht interessant gewesen —, daß die im Chloroform kolloiddispersen Cerebrosidteilchen ein (wahres) Lösungsvermögen für den Farbstoff besessen hätten. Dies scheint nun nicht der Fall zu sein. Wenn auch die Verbindungslinie der drei bestimmten Punkte der Fig. 6 eine annähernde Gerade darstellt, so schneidet diese doch die Abszissenachse nicht im O-Punkt, wie dies für die lineare Kurve des Henry-Satzes zu verlangen wäre. Vor allem aber ist der Quotient $\frac{x}{m} : c$ nicht nur nicht konstant, sondern er zeigt ein kontinuierliches Ansteigen mit sinkender Konzentration. Umgekehrt stimmen die berechneten Potentialfaktoren $\left(\frac{1}{n}\right)$, 0,19 und 0,13, sowie die Adsorptionskonstanten 1,62, 1,59 und 1,71 gut überein. Es ist also auch die Methylenblauaufnahme durch Cerebrosid eine Adsorption und keine Verteilung, und es verhält sich das Cerebrosid dem Farbstoff gegenüber ebenso wie das Kephalin, während beide umgekehrt in einem Gegensatze zum Cholesterin stehen.

4. Das Gleichgewicht in dem System: „Restlipoide"—Chloroform=wässeriges Methylenblau.

Es erschien nunmehr in Ermangelung weiterer reiner Lipoide am zweckmäßigsten, zum Schluß noch ein Gemenge von Lipoiden zu prüfen, in dem gerade alle die Lipoide zusammen enthalten waren, die in den bisherigen Versuchen noch nicht berücksichtigt worden waren, und in dem gerade diejenigen fehlten, die sich zuvor schon, einzeln untersucht, als stärkere Adsorbentien erwiesen hatten. Es wurde also zu dem folgenden Versuch ein chloroformiger Gehirnextrakt verwendet, der durch Alkoholfällung kephalinfrei gemacht worden war; ziemlich weitgehend werden durch eine solche Alkoholfällung mit nachfolgendem „Ausfrieren" auch die Cerebroside entfernt, so daß die in der alkoholischen Lösung zurückgebliebenen „Restlipoide" vor-

wiegend aus Phosphatiden, und zwar unter Ausschluß des Kephalins, bestehen; der Einfachheit wegen wird der Trocknungsrückstand dieser alkoholischen Lösung als „Restlipoide" bezeichnet.

Versuch 6.

Heterogene Phase: Je 100 ccm einer 2,5%igen Lösung von „Restlipoiden" in Chloroform; wässerige Phase: Methylenblaulösung in 4 verschiedenen Konzentrationen.

Versuchsdauer: 16 Tage.

Tabelle VIII.

Nummer	a	$\frac{x}{m}$	c	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k $\left(\text{für } \frac{1}{n} = 0{,}22\right)$
1	3,125	0,560	1,724	0,33	aus 1 u. 2: 0,130	0,516
2	1,563	0,460	0,414	1,11	„ 2 u. 3: 0,162	0,526
3	0,781	0,300	0,030	10,04	„ 1 u. 3: 0,154	0,512
4	0,391	(unt. 0,154)	(üb. 0,007)	(üb. 22,55)	(„ 3 u. 4: 0,453)	(üb. 0,328)
					Im Mittel: 0,22	0,518 (> 4,479)

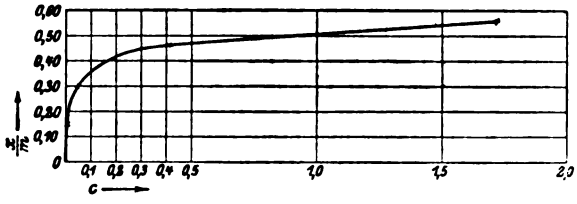


Fig. 8.

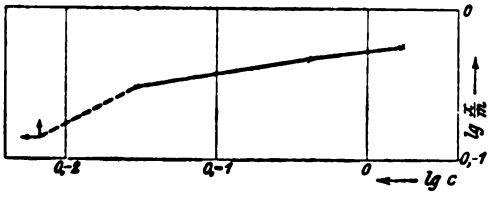


Fig. 9.

Lassen wir, so wie dies schon beim Kephalin geschehen mußte, wegen der Insuffizienz der Bestimmungsmethode bei sehr niedrigen Konzentrationen die im Einzelversuch 4 gefundenen Werte außer acht, so findet sich auch in diesem Falle eine reine Adsorption; die Kurve der Logarithmen verläuft linear

und mit einem Neigungswinkel von weit unter 45°; die einzelnen berechneten $\frac{1}{n}$-Werte und die Werte der Adsorptionskonstante stimmen untereinander sehr gut überein. Bemerkenswert ist in diesem letztuntersuchten Falle, daß das Cholesterin praktisch von so geringem Einfluß auf die Art der Farbstoffaufnahme ist. Das Cholesterin, das in allen Gehirnextrakten mit organischen Lösungsmitteln bekanntlich in sehr beträchtlicher Menge enthalten ist, wurde nämlich, wie aus den Angaben über die Gewinnung des hier geprüften „Restlipoid"-Gemisches hervorgeht, nicht entfernt, muß also einen recht bedeutenden Teil desselben ausmachen. Trotzdem fällt seine Anwesenheit bei der Gestaltung der Kurve gar nicht ins Gewicht.

5. Das Gleichgewicht in dem System: Leinöl—Chloroform/Methylenblau—Wasser.

Es ist bekannt, daß der Umfang alles dessen, was von den verschiedenen Autoren bisher unter der Bezeichnung „Lipoide" zusammengefaßt wurde, ein sehr wechselnder ist. Am weitesten geht wohl Bang, der als Lipoid alles das zusammengefaßt wissen will, was in organischen Lösungsmitteln löslich ist. Er betont dabei bewußt die eine Folgerung aus dieser Begriffsfassung, zu der wohl die Schöpfer des Lipoidbegriffs eigentlich nicht hatten Anlaß geben wollen, daß demnach auch eine große Anzahl von organischen Substanzen, die bisher niemandem zu den Lipoiden zu rechnen in den Sinn gekommen ist, diesen zugerechnet werden müssen. Sicherlich ist es nicht diese eine Eigenschaft der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, was die Zusammengehörigkeit der lipoiden Substanzen ausmacht, eine Zusammengehörigkeit, auf die aufmerksam gemacht zu haben stets ein Verdienst der Schöpfer der Lipoidtheorie sein wird. Umgekehrt sind auch schon in dem vorausgehenden Teile dieser Arbeit Gesichtspunkte angedeutet, unter denen eine Präzisierung des Lipoidbegriffes aussichtsreich erscheint. Wenn trotzdem nun in den folgenden Abschnitten einige Substanzen behandelt werden, die man nicht zu den Lipoiden im engeren Sinne zu rechnen pflegt, so geschieht dies aus besonderen Gründen. Leinöl und Thymol, um die es sich hier handeln wird, sind deswegen von einigem Interesse, weil sie in den Untersuchungen

von Overton über die Farbstoffaufnahme durch Lipoide eine Rolle spielten. Das Olivenöl, das von ihm als Hauptlösungsmittel für die zu färbenden Lipoide verwendet wurde, bezeichnet er als eine Methylenblau in einem gewissen, wenn auch nicht sehr hohen Grade lösende Substanz; zwar hat er das Leinöl nicht in dem gleichen Umfange angewandt, doch gibt er an, daß es sich bei seiner Prüfung genau wie das Olivenöl verhielt. Das Thymol erwähnt er mehrfach als eine Methylenblau besonders stark lösende Substanz. Beide legen daher eine Prüfung an der Hand unserer Fragestellung nahe.

Das Leinöl, das zunächst untersucht wurde (zur Verwendung kam ein von der Chem. Fabrik Gebr. König bezogenes, reines Leinöl), ergab das in den folgenden Tabellen zusammengestellte Resultat.

A. Die Farbstoffkonzentration als unabhängige Variable.

Versuch 7.

Heterogene Phase: Je 100 ccm Leinöl mit je 100 ccm Chloroform gemischt. Wässerige Phase: Je 150 ccm Methylenblaulösung in 3 verschiedenen Konzentrationen.

Versuchsdauer: 35 Tage.

Tabelle IX.

Nummer	a millimol	$\frac{x}{m}$ $\frac{\text{millimol}}{\text{ccm}}$	c millimol	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k $\left(\text{für } \frac{1}{n} = 0{,}145\right)$
1	6,25	0,0106	5,19	0,0204	—	—
2	4,17	0,0139	2,78	0,0500	0,145	0,012
3	2,08	0,0118	0,90	0,01313		0,012

B. Das Chloroformvolumen als unabhängige Variable.

Versuch 8.

Heterogene Phase: Je 100 ccm Leinöl mit 3 verschiedenen Volumina Chloroform gemischt. Wässerige Phase: Je 150 ccm Methylenblaulösung (2,08 millimol pro Liter).

Versuchsdauer: 37 Tage.

Tabelle X.

Nummer	Chloroformvolumen	a	$\frac{x}{m}$	c
1	0	2,08	0,01108	0,972
2	100	2,08	0,01005	1,075
3	400	2,08	0,02012	0,068

Man sieht auf den ersten Blick, daß die Verhältnisse bei der Farbstoffaufnahme durch Leinöl keineswegs so liegen, wie dies Overton annahm. Von einer einfachen Lösung des

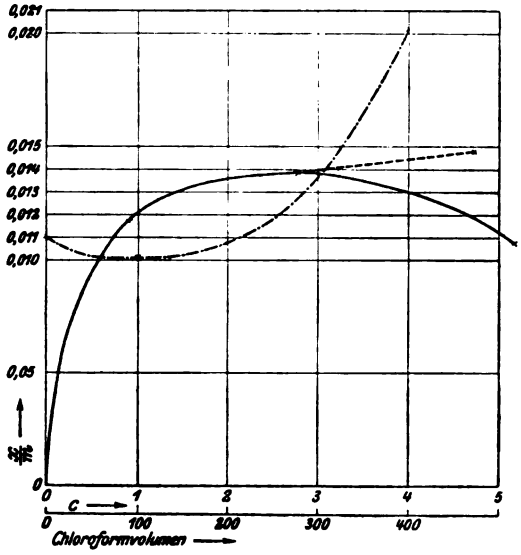


Fig. 10.

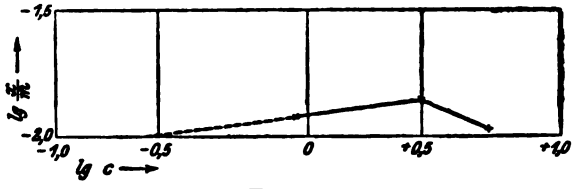


Fig. 11.

Farbstoffs im Öl kann nach den Versuchen kaum die Rede sein, denn das Ansteigen des „Teilungskoeffizienten", bzw. des Quotienten $\frac{x/m}{c}$ mit fallender Konzentration ist für 1 und 2 augenfällig genug. Dementsprechend ist auch die $\frac{x/m}{c}$-Kurve nicht linear. Daß umgekehrt eine reine Adsorption stattfindet, dagegen spricht, daß die Aufnahme nicht unabhängig von dem Volumen des heterogenen Dispersionsmittels (des Chloroforms) ist, wie das der zweite Versuch (Versuch 8) lehrt. Demnach

sind die Verhältnisse schon unter Berücksichtigung dieser beiden Punkte, des gekrümmten Verlaufs der Kurve einerseits, der Abhängigkeit von dem Chloroformvolumen andererseits, sicher ziemlich kompliziert. Schon aus dem Zusammentreffen dieser beiden einander entgegenlaufenden Erscheinungen kann man — und die Tatsache, daß wir es ja im Leinöl nicht mit einer einheitlichen Substanz, sondern mit einem Gemisch zu tun haben, erleichtert diesen Schluß — annehmen, daß vermutlich beide Prozesse, Adsorption und Verteilung, nebeneinander vorliegen. Noch komplizierter wird aber der Vorgang, wenn man nun noch den letzten Teil der Kurve 10 mit berücksichtigt. Während nämlich der erste Teil der Kurve (Bestimmung 2 und 3) ganz gut nach einer Adsorptionsisotherme mit dem Exponentialfaktor $\frac{1}{n} = 0{,}145$ und einer Adsorptionskonstanten $k = 0{,}012$ sich berechnen läßt, weicht der letzte Teil von einer solchen Kurve ab. Diese Änderung der Verlaufsart der Kurve kann wohl am ehesten durch eine Zustandsänderung innerhalb der mikroheterogenen organischen Phase, des Chloroform=Leinöl-Komplexes, erklärt werden. Vermutlich wird es sich um eine Veränderung — und zwar Vergröberung, da die doch wohl vorwiegend durch Adsorption bedingte Farbstoffaufnahme abnimmt — des Dispersitätsgrades der dispersen Phase, des Leinöls bzw. eines oder mehrerer seiner kolloiden Bestandteile, handeln. Da die Farbstoffkonzentration die einzige Variable des Versuchs ist, muß die höhere Anfangskonzentration (a) des Adsorbendums die Ursache dieser Zustandsänderung im Chloroform-Sol sein. Gestützt wird diese Auffassung dadurch, daß sich schon mit bloßem Auge in dem Gemisch größere, stark blau gefärbte Klumpen, die nicht den Eindruck von einfachen Emulsionsballen machen, entdecken lassen, die erst während des Färbeprozesses aufgetreten waren. Es ist also am wahrscheinlichsten, daß, von einer gewissen Anfangskonzentration ab sich bemerkbar machend, das Adsorbendum eine Agglutination der Teilchen der im Chloroform dispersen Phase verursacht, so daß die adsorptionsfähige Oberfläche Leinöl=Chloroform verringert wird. Ob dieser Einfluß des Methylenblaus ein unmittelbarer oder ein nur mittelbarer ist, kann nur schwer entschieden werden. Es ist natürlich auch das letztere denkbar, daß nämlich etwa ein chemischer Vorgang

mit im Spiele ist; das Leinöl enthält ja doch in den ungesättigten Fettsäuren Substanzen, die chemisch nicht eben unempfindlich sind. Wichtig ist jedenfalls, daß sich schon der Deutung des physikalisch-chemischen Prozesses bei der Farbstoffaufnahme durch das Leinöl Schwierigkeiten in den Weg stellen, bei einem einfachen Gemisch von Triglyceriden also, das doch sozusagen noch „lipoider" als die Lipoide ist.

Die gleiche Deutung, wie sie soeben versucht wurde, muß wohl auch herangezogen werden bei der Beantwortung der Frage, wie denn in dem Versuch 8 der unregelmäßige Verlauf der $\frac{x/m}{v}$-Chloroformkurve zu erklären ist. Wahrscheinlich, und diese Annahme ist noch ungezwungener wie die Annahme eines solchen Einflusses der Farbstoffkonzentration, hat auch das Chloroformvolumen, die Menge des Dispersionsmittels, einen Einfluß auf den Dispersitätsgrad des Öles bzw. seiner kolloiden Bestandteile. Es bestünde dann auch wieder eine Analogie dieser Chloroformlösungen mit den wässerigen Seifenlösungen, deren Dispersitätsgrad mit steigender Konzentration vom molekularen zum kolloiden übergeht. Bestätigt sich die Erklärung, so müßten dann die Öle, mindestens in chloroformiger Lösung, als Semikolloide aufgefaßt werden.

6. Das Gleichgewicht in dem System: Thymol—Chloroform/Methylenblau—Wasser.

Das Thymol bietet vor dem Leinöl den Vorzug, daß man es mit einer reinen Substanz anstatt eines Gemisches zu tun hat. Es war also zu erwarten, daß die Verhältnisse bei ihm nicht so schwer übersehbar sein würden, wie sie sich für das Leinöl in dem vorigen Abschnitt zeigten.

A. Die Farbstoffkonzentration als unabhängige Variable.

Versuch 9.

Heterogene Phase: Je 7,5 g Thymol in je 150 ccm Chloroform; wässerige Phase: Methylenblaulösung in drei verschiedenen Konzentrationen.

Versuchsdauer: 20 Tage.

Tabelle XI.

Nummer	a	$\frac{x}{m}$	c	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k (für $\frac{1}{n} = 0{,}16$)
1	3,125	0,0290	2,908	0,010	0,20	0,024
2	1,562	0,0249	1,376	0,018	0,12	0,024
3	0,781	0,0239	0,602	0,040	—	0,026
				Im Mittel	0,16	0,025

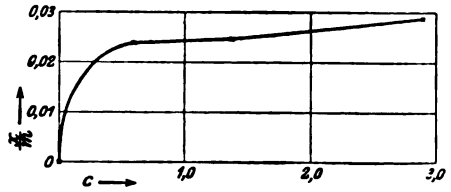


Fig. 12.

$$\frac{\text{Ordinate}}{\text{Abszisse}} = \frac{40}{1}.$$

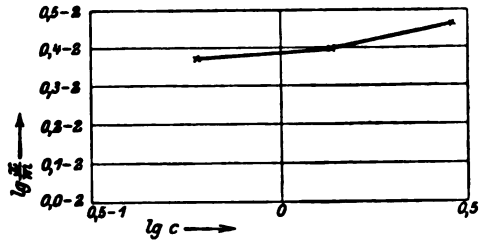


Fig. 13.

B. Das Chloroformvolumen als unabhängige Variable.

Versuch 10.

Heterogene Phase: Je 5 g Thymol, gelöst in drei verschiedenen Volumina Chloroform; wässerige Phase: 1,5625 millimolare Methylenblaulösung.

Tabelle XII.

Chloroformvolumen ccm	a	$\frac{x}{m}$	c
20	1,562	0,0894	1,115
100	1,562	0,0249	1,376
400	1,562	0,0123	1,501

Die Versuche bestätigen die Vermutung; es finden sich in der Tat einfach zu deutende Verhältnisse. Die aus dem Versuch 9 resultierenden Kurven können zwanglos als Adsorptionskurven aufgefaßt werden. Für eine Aufnahme durch Verteilung besteht keine Grundlage. Interessant ist aber das Ergebnis des Versuches 10. Trotzdem die Farbstoffaufnahme auf Adsorption zurückgeführt werden muß, trotzdem also die aufnehmende Substanz in einem, adsorptionsbefähigte Oberflächen aufweisenden, also kolloiden Zustand, sonach ohne engere Be-

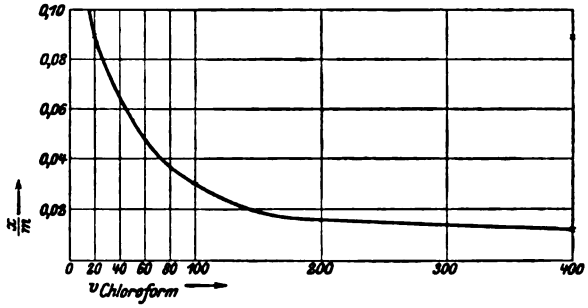


Fig. 14.

ziehung zum Dispersionsmittel, vorhanden sein muß, ist doch die Konzentration im Dispersionsmittel nicht gleichgültig. Bemerkenswerterweise verringert aber diesmal die zunehmende Chloroformmenge die Farbstoffaufnahme, während im Falle des Cholesterins sowohl wie in dem Falle des Leinöls das Umgekehrte der Fall war. Bei einer durch Adsorption bedingten Stoffaufnahme kann aber ein die Aufnahme vermindernder Einfluß nur so zustande kommen, daß die adsorbierende Oberfläche verkleinert, d. h. die Zahl der kolloiden Teilchen verringert wird. Eine Zustandsänderung kann wohl kaum die Ursache dieser Oberflächenverminderung sein, denn es ist nicht anzunehmen, daß weiterer Chloroformzusatz fällend auf die in Chloroform dispergierten Kolloidteilchen wirken kann. Es bleibt also nur übrig, anzunehmen, daß der Dispersitätsgrad durch Vermehrung der Chloroformmenge im umgekehrten Sinne beeinflußt und die Teilchenzahl dadurch verringert wird, daß ein Teil der kolloiddispersen Phase durch molekulare Auflösung im Dispersionsmittel verschwindet. Und es wird dann dieser echt gelöste Teil des Thymols an der Farbstoff-

aufnahme nicht mitwirken. Es ist also das Thymol in Chloroformlösung ein Semikolloid; seine Farbstoffaufnahmefähigkeit ist an seinen Dispersitätsgrad gebunden; nur der kolloide Zustand ermöglicht die Aufnahme, die rein durch Adsorption erreicht wird, während die molekulardisperse Lösung des Thymols keine oder höchstens eine verschwindend geringe Lösefähigkeit für Methylenblau besitzt. Auf die theoretische Bedeutung dieser Beobachtung kann hier leider nicht näher eingegangen werden. Es sei nur darauf hingewiesen, daß die augenfällig vorhandene capillare Affinität bei fehlender molekularer Affinität die Thymolfarbstoffbindung den wenigen Beispielen anreiht, an denen sich ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Adsorption und chemischer Bindung demonstrieren läßt.

* * *

Zum Schluß dieser Versuchsreihen seien hier noch einige Versuche mit anderen Lipoiden und anderen Farbstoffen kurz berührt. Über das Lecithin (Ovolecithin Merck) lassen sich quantitative Feststellungen mit der obigen Versuchsanordnung nicht machen; neben der Konzentrationsverminderung des Farbstoffs in der wässerigen Phase durch eine zweifellos erhebliche Aufnahme findet hier eine Konzentrationsverminderung durch Wasserabgabe an das quellende Lecithin statt, so daß zuerst ein Studium der Quellungsgesetze der Lipoide erforderlich sein wird.

Von sauren Farbstoffen wurde das Krystallponceau mit der gleichen Versuchsanordnung unter Verwendung von „Restlipoid" geprüft; es wird sicher aufgenommen, doch war zu einer Messung mit der Pelet-Garutischen Methode der Konzentrationsverlust der wässerigen Phase zu gering.

7. Die Wiederabgabe des durch das Lipoid aufgenommenen Farbstoffes.

Nach der auf dem Henry-Satze beruhenden Auffassung Overtons muß die „Auswaschung" des aufgenommenen Farbstoffes aus dem Lipoid leicht zu bewerkstelligen sein. Für eine auf Adsorption beruhende Aufnahme braucht dies nicht zuzutreffen. In der Tat ist die Auswaschbarkeit des Methylen-

blaus aus den gefärbten Lipoiden, und zwar auch aus Cholesterin, eine sehr geringe. Diese bei einem reinen Adsorptionsprozeß zu beobachtende „Echtheit" der Färbung hat bereits Freundlich beachtet und erklärt[1]). Wie groß die „Affinität" zwischen Lipoid und Farbstoff ist, geht aus folgendem hervor: Setzt man zu 1 bis 2%igen Krystallponceaulösungen, die längere Zeit über Chloroformlösungen von „Restlipoid" gestanden und diesem eine schwach rötliche Färbung verliehen haben, eine kleine Menge wässerigen Methylenblaus, so entsteht in der oberen wässerigen Schicht der praktisch unlösliche Farblack, und diese wird dadurch trübe und violett gefärbt; schüttelt man nun einige Zeit kräftig durch und läßt dann die entstehende Emulsion sich wieder trennen, so zeigt sich die Lipoid-Chloroformlösung rein blau gefärbt und die zuvor trübe und violett gewordene wässerige Schicht hat wieder nahezu die ursprüngliche rein rote Farbe angenommen; demnach ist das Lipoid imstande, den unlöslichen Farblack aufzuspalten und ihm seine basische Methylenblaukomponente wieder zu entreißen.

Es ist also nicht zu erwarten, daß eine etwaige Lipoidmembran an der Zelle die Aufnahme von basischen Farbstoffen ins Zellinnere begünstigen wird. Um ein Bild von dem Grad dieser Wiederabgabe auf der anderen Seite der Membran zu gewinnen, wurden folgende Versuche angestellt: Es wurde zwischen eine wässerige Farbstofflösung und eine Phase reinen Wassers ein Diaphragma aus Lipoid zwischengeschaltet und beobachtet, ob und wann der Farbstoff in der jenseitigen wässerigen Phase auftaucht; um die Unzuverlässigkeit einer reinen Lipoidmembran in bezug auf Intaktheit zu vermeiden, wurde als Lipoidmembran eine Lösung von Lipoid — und zwar „Restlipoid" — in Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff verwendet; um die Zwischenschaltung bequem vornehmen zu können, wurde der Farbstoff in einer mehrprozentigen Gelatine gelöst. Die Versuche wurden dann in Reagensgläsern angesetzt, in denen über die gefärbte Gelatine eine Lipoidschicht, darüber reines Wasser geschichtet wurde. Das Ergebnis solcher Versuche mit verschiedenen Farbstoffen findet sich in der folgenden Tabelle XIII.

---

[1]) H. Freundlich, Capillarchemie, Leipzig 1910, S. 531.

Als Kontrolle diente die gleiche Versuchsanordnung, bei der aber das Diaphragma aus reinem, lipoidfreiem organischem Lösungsmittel hergestellt war.

Tabelle XIII[1]).

Farbstoff	Kontrolle		Hauptversuch	
	Chloroform	Wasser	Chloroform	Wasser
Methylenblau med. .	—[2])	—	Stark +[2])	—
Methylorange . . .	—	—	+	Spur +?
Orange G	—	—	+	Schwach +
Kongorot	—	—	Schwach +	—
Krystallponceau . .	—	—	+	Schwach +
Säurefuchsin	—	—	+	„ +
Brillantgrün	+?	Spur +	Stark +	Spur +?
Methylgrün	Schwach +	+	„ +	—
Safranin	„ +	+	„ +	+
Viktoriablau	„ +	—	„ +	—
Vesuvin	„ +	+	„ +	+
Karminsaures Na . .	—	—	—	—

Die Tabelle gibt das Ablesungsergebnis nach 6tägiger Versuchsdauer an.

Die ersten 6 Farbstoffe zeigen ein sehr eindeutiges Ergebnis; das Lipoid vermittelt ihren Übergang in die jenseitige Phase, der durch das Chloroform (bzw. den Tetrachlorkohlenstoff) allein verhindert wird. Freilich ist dieser Übergang aus der farbstoffreichen Zwischenschicht sehr gering. Das Gegenstück liefert der letzte Farbstoff, der weder das reine, noch das Lipoidchloroform zu durchdringen vermag. Die dazwischenstehenden Farbstoffe sind in Chloroform allein bereits löslich, an ihnen läßt sich also der vermittelnde Einfluß des Lipoids nicht so rein studieren. Doch zeigt sich bei ihnen, daß die zweite wässerige Phase im Hauptversuch meist weniger stark gefärbt ist als in der Kontrolle.

Es vermag also zwar in der Tat eine Lipoidmembran Farbstoff an eine jenseitige Wasserphase wieder abzugeben. Aber ihre Zwischenschaltung zwischen zwei Wasserphasen wirkt auf die Farbstoffdiffusion von der farbstoffhaltigen in die farbstoff-

[1]) + bezeichnet, daß die Phase gefärbt wurde, —, daß sie ungefärbt blieb.

[2]) Es wurde bei diesem Farbstoff anstatt des Chloroforms Tetrachlorkohlenstoff verwendet, da in diesem das Methylenblau vollständig unlöslich ist.

freie Phase im Sinne einer Verringerung bzw. Hysteresis der Färbung. Bestünde also die Zellmembran nur aus Lipoiden, so wäre dies für eine rasche und reichliche Färbung des Zellinnern nicht von Vorteil.

8. Zusammenfassung.

Es lassen sich also nach ihrem Verhalten gegen Methylenblau in organischem Lösungsmittel folgende vier Typen der fettartigen Substanzen unterscheiden:

1. Kephalin, Cerebrosid, „Restlipoide", also wohl die Mehrzahl der im Tierkörper vorkommenden Lipoide; sie sind starke Adsorbentien und stellen im organischen Lösungsmittel echte Kolloide dar.

2. Leinöl; die Farbstoffaufnahme dieser Gruppe ist zwar im wesentlichen auch ein Adsorptionsvorgang, doch ist sie nicht unabhängig von der Menge des organischen Dispersionsmittels. Ihr Dispersitätsgrad wechselt mit dem Mengenverhältnis zwischen innerer und äußerer Phase; die kolloiden Anteile neigen außerdem zu einer durch das Adsorbendum bewirkten Zustandsänderung. Wahrscheinlich stellen die Substanzen dieser Gruppe an sich schon ein kompliziertes Gemisch von Kolloiden, Semikolloiden und als Dispersionsmittel für diese fungierenden flüssigen Komponenten dar.

3. Thymol; die Farbstoffaufnahme selbst ist eine Adsorption, doch nimmt mit zunehmender Verdünnung im organischen Dispersionsmittel die Färbbarkeit ab. Das Dispergendum ist ein Semikolloid.

4. Eine vierte Gruppe bildet wahrscheinlich das Cholesterin. Die — schwache — Färbbarkeit ist wahrscheinlich ganz oder teilweise durch Verteilung bedingt. Das Verhalten zum Dispersionsmittel ist wohl ein ähnliches, wie das des Thymols; es handelt sich vermutlich auch um ein Semikolloid, wenn auch mit starker Neigung zu echter Lösung. Die Färbbarkeit nimmt jedoch mit zunehmender Verdünnung zu, so daß wahrscheinlich die echt gelösten Anteile die Hauptträger der Färbbarkeit sind[1]).

[1]) Mit einer in den anschließenden Arbeiten ausgeführten Begründung wird für die Substanzen der 1. Gruppe die Bezeichnung „Lipoide", für die der 3. und 4. Gruppe die Bezeichnung „Semilipoide" vorgeschlagen; die 2. Gruppe stellt eine Kombination beider mit einer echt lösenden Komponente dar.

Dies die Gruppierung, die nach dem Verhalten der hier studierten „fettartigen" Substanzen bei der Färbung vorgenommen werden muß.

Was den Vorgang der Farbstoffaufnahme betrifft, so ist also das Ergebnis zu verzeichnen, daß, abgesehen von dem Cholesterin, dessen besondere Stellung den übrigen Lipoiden gegenüber später noch näher erörtert werden muß, die im Organismus vorkommenden Lipoide sich nicht von den übrigen Tinktionsobjekten unterscheiden. Im Gegensatz zu der Auffassung Overtons, der glaubte, daß die sog. Vitalfärbung auf der auswählenden Löslichkeit der lipoiden Substanzen beruhe, kann man also aus dem Bisherigen als erwiesen annehmen, daß es sich, wie bei allen Färbeprozessen, um eine Adsorption[1]) handelt.

Von den praktischen Erfahrungen aus betrachtet, ist diese Erklärung durch Adsorption auch wohl einleuchtender als die durch Lösung nach dem Henryschen Satze. Da die intra vitam einverleibten Farbstoffe ziemlich rasch wieder ausgeschieden werden, so ist nicht gut vorstellbar, daß die vitalfärbbaren Lipoide den Farbstoff, wenn sie ihn nur durch einfaches Lösungsvermögen aufgenommen haben, so lange festhalten; wie denn z. B. auch die Auswaschbarkeit aus den vital gefärbten histologischen Schnittpräparaten eine viel größere sein müßte, als sie tatsächlich ist. Dies alles wird aber dann sehr leicht verständlich. wenn eben die Vitalfärbung eine Adsorption ist, und wenn den vitalfärbbaren Lipoiden ein größeres Adsorptionsvermögen zukommt, als den übrigen Gewebsbestandteilen.

Über die Analogie der Farbstoffadsorption der Lipoide mit der Adsorption, im besonderen der Farbstoffadsorption, durch andere Adsorbentien läßt sich zusammenfassend folgendes sagen:

1. Die ermittelten Werte für den Exponentialfaktor $\frac{1}{n}$ und die Adsorptionskonstante k finden sich in der Tabelle XXII nebeneinandergestellt.

---

[1]) Man bleibt sich dabei bewußt, daß die Breite der Anwendbarkeit des theoretisch abgeleiteten Adsorptionsbegriffes noch strittig ist; immerhin scheint aber gerade eine der hier untersuchten Substanzen, das Thymol, geeignet, die prinzipielle Selbständigkeit — unbeschadet der Möglichkeit fließender Übergänge — zu erweisen.

Tabelle XXII.

Adsorbens	$\frac{1}{n}$	k
Kephalin	0,35	6,80
Cerebrosid	0,16	1,64
Restlipoide	0,22	0,51
Thymol	0,16	0,025
Leinöl	0,15	0,012
(Cholesterin)	(0,45)	(0,03)

Die Exponentialfaktoren für Adsorptionen an Grenzflächen: fest-flüssig schwanken im allgemeinen in ihrem Werte zwischen 0,2 und 0,5, doch sinken sie gerade bei der Farbstoffadsorption zuweilen unter den unteren Grenzwert; die für die Adsorption von zahlreichen sauren und basischen Farbstoffen durch Blutkohle, Wolle und Seide von Freundlich und Losev[1]) bestimmten $\frac{1}{n}$-Werte bewegen sich z. B. ausschließlich zwischen 0,186 und 0,125, und die von Pelet und Grand[2]) gerade für das Methylenblau ermittelten Exponentialfaktoren betragen bei Verwendung von Kohle als Adsorbens 0,12, von Kieselsäure 0,14 und von Kieselgur 0,11. Unsere Größen decken sich also in vollem Umfange mit den bisher für Farbstoffadsorptionen bekannten.

Die k-Werte sind der Ausdruck des Grades der Adsorption. Es steht das Kephalin allen geprüften Lipoiden, einschließlich wohl des Lecithins, an Adsorptionskraft voran, auch das Cerebrosid ist dem kephalinfreien Lipoidgemenge noch ziemlich überlegen, während die anderen Substanzen, darunter vor allem auch das Cholesterin, hinter ihnen außerordentlich zurückstehen.

2. Für die Abhängigkeit der Adsorption von dem Adsorbens und seinem Lösungsmittel ist folgendes zu erörtern: Stoffe, die in Wasser stark adsorbiert werden, werden im allgemeinen in organischen Lösungsmitteln schwach absorbiert, und umgekehrt. In welchem Lösungsmittel findet nun bei unseren Versuchen die Adsorption statt? Das verwendete Methylenblaupräparat ist in Chloroform nicht ganz unlöslich; man könnte sich also zunächst vorstellen, daß nur das in

[1]) l. c.

[2]) Pelet und Grand, Kolloid-Zeitschr. 2, 41, 1907.

Chloroform gelöste Methylenblau von dem in diesem dispergierten Lipoid adsorbiert wird. Es würde dann das durch Adsorption dem Chloroform entzogene Methylenblau mit Hilfe des sich wiederherstellenden Verteilungsgleichgewichtes zwischen Wasser und Chloroform in diesem letzteren immer wieder erneuert werden, und es könnte so trotz der geringen Löslichkeit des Farbstoffes im Chloroform bis zur Sättigung adsorbiert werden. Die zweite Möglichkeit wäre die, daß der Adsorptionsvorgang sich im wässerigen Lösungsmittel abspielt; wenn sich nämlich auch eigentlich das Lipoid im organischen Lösungsmittel befindet, so daß zunächst nur eine Grenzfläche: Lipoid-Chloroform vorstellbar ist, an der sich die Adsorption in der soeben beschriebenen Weise abspielen müßte, so wird doch aus der anschließenden Arbeit hervorgehen, daß gerade diejenigen Lipoide, welche stark adsorbieren, die Oberflächenspannung ihres organischen Dispersionsmittels stark erniedrigen. Damit ist nun auch eine Grenzfläche: Lipoid-Wasser gegeben. Somit haben wir also die Möglichkeit, uns vorzustellen, daß die Adsorption unmittelbar aus dem wässerigen Lösungsmittel des Farbstoffes heraus an dieser Grenzfläche Lipoid-Wasser vor sich geht. Es wären hier wohl auch die Ausführungen Freundlichs (Capillarchemie S. 157 ff.) zu berücksichtigen, nach denen die Adsorption in organischen Lösungsmitteln überhaupt im allgemeinen gering ist; besonders gilt dies noch von solchen Stoffen, die, wie die Farbstoffe, erwiesenermaßen aus wässrigem Lösungsmittel stark adsorbiert werden. Ein weiteres Moment zugunsten dieser Vorstellung ist, daß die Färbung der Chloroformphase, wenn auch noch lange kein Gleichgewichtszustand erreicht ist, doch (vgl. S. 161) sehr rasch einen ziemlich hohen Grad annimmt. Es würde wohl kaum ausreichen, wenn man zur Erklärung dieser raschen „Diffusion" nur auf die Vorstellung angewiesen wäre, daß der zur Adsorption verbrauchte Farbstoff durch Diffusion neuen Farbstoffes in das Chloroform hinein sich so rasch wieder ergänzte. Wenn hingegen die stark adsorptionsfähigen Grenzflächen Lipoid-Wasser der an die Oberfläche des Chloroforms adsorbierten kolloiden Lipoidteilchen sich rasch mit dem Farbstoff sättigen, so wird nun wiederum eine Störung in dem Gleichgewicht dieser an die Chloroformoberfläche adsorbierten Lipoidteilchen gegenüber

dem Chloroform eintreten, welche dadurch ausgeglichen wird, daß die mit Farbstoff abgesättigten Lipoidteilchen durch neue, noch nicht mit Farbstoff versehene und deshalb stärker an die Oberfläche des Chloroforms adsorbierbare verdrängt werden. Durch dieses Spiel der Oberflächenkräfte wird in der Chloroformphase eine Strömung zustande kommen, welche für die Erreichung des Farbstoffgleichgewichts zweifellos viel geeigneter ist, als der Diffusionsstrom des im Chloroform frei gelösten Farbstoffes; dieser kann nur schwach sein, da die niedrige Sättigungskonzentration auch ein geringes Diffusionsgefälle bewirkt. Am besten wird sich dieser Vorgang dann erweisen lassen, wenn der zu adsorbierende Farbstoff in Chloroform wirklich absolut unlöslich ist.

3. Über die Abhängigkeit der Adsorption von der Temperatur liegen eigene Versuche nicht vor; unsere Versuche sind sämtlich bei Zimmertemperatur angestellt. Nach Freundlich[1]) nimmt der Wert von $\frac{1}{n}$ mit steigender Temperatur zu; er nähert sich demnach 1 und die Adsorptionsisotherme muß sich somit abflachen und der Verteilungskurve ähnlicher werden; es ist also schon möglich, daß sich nach Versuchen bei hoher Temperatur (Overton) der Vorgang leichter mit einer Verteilung nach dem Henryschen Satze verwechseln läßt (wohlgemerkt, wenn überhaupt Konzentrationskurven aufgenommen werden, was Overton unterlassen hat). Die Abhängigkeit $\frac{dk}{dt}$, die Veränderung des Grades der Adsorption mit wechselnder Temperatur, ist nicht so allgemein umschrieben. Für die Gase nimmt zwar die Adsorption mit steigender Temperatur ab, für die Grenzfläche fest-flüssig oder flüssig-flüssig können aber auch positive Temperaturkoeffizienten vorkommen, wie einen solchen gerade für die Adsorption von Methylenblau Pelet und Grand ermittelt haben. Es ist dies von Wichtigkeit für die beim Cholesterin (S. 166ff.) näher erörterte Frage, ob sich die von uns bei niedrigen Temperaturen gefundene geringe Farbstoffaufnahme mit der Overtonschen Angabe einer guten Färbbarkeit bei höheren Temperaturen vereinbaren läßt; nach dem eben Gesagten muß man eine solche Möglichkeit wohl bejahen.

[1]) Capillarchemie, S. 101ff. und 171.

4. Für die Feststellung der Adsorptionsgeschwindigkeit war die Anordnung unserer Versuche nicht gerade günstig. Einmal arbeiteten wir ja in Abweichung von der gewöhnlichen Versuchsanordnung nicht in einem zweiphasigen Gemisch mit nur einem Dispersionsmittel für Adsorbens und Adsorbendum, sondern es waren für Adsorbens und Adsorbendum zwei verschiedene, nicht miteinander mischbare Dispersionsmittel vorhanden; das Dispersionsmittel des Adsorbens verhielt sich zudem gegen das Adsorbendum refraktär und bildete also eine der raschen Reaktion zwischen Adsorbens und Adsorbendum stark im Wege stehende Zwischenschicht. Außerdem aber mußten wir aus den früher (S. 155 ff.) diskutierten Gründen des wesentlichsten Hilfsmittels zur Erzielung einer maximalen Adsorptionsgeschwindigkeit, des Schüttelns, völlig entraten. Dieser Mangel ließ sich schon daran erkennen, daß sich manchmal der untere, dem Chloroform-Lipoid zugekehrte Teil der wässerigen Farbstofflösung bereits sehr stark entfärbt fand, während darüber noch eine Schicht stand, die an Konzentration noch kaum eingebüßt hatte; eine Erscheinung, aus der zugleich auch der dritte ungünstige Umstand am besten hervorgeht, daß nämlich der hochmolekulare Farbstoff auch noch eine verhältnismäßig geringe Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser besitzt. Wenn wir also im Gegensatz zu den gewöhnlichen Adsorptionsversuchen, bei denen sich schon nach einem Umschütteln von wenigen Minuten die Konzentration der Lösung des Adsorbendums nur noch um wenige Prozente von der Gleichgewichtskonzentration unterscheidet, eine sehr lange Zeitdauer bis zu der Erreichung des Gleichgewichts feststellten, so kann daraus nicht geschlossen werden, daß ein Unterschied zwischen der Art der Adsorption durch Lipoide und der durch andere Stoffe besteht. Daß auch in unseren Fällen, so wie dies aus den Versuchen von Lagergren[1]) hervorgeht, die $\frac{x}{z}$-Kurve einen logarithmischen Verlauf hat, geht schon aus einem Blick auf die Tabellen II und IV (S. 161 und 164) hervor[2]). Noch deutlicher wird dies, wenn man sich die in der Freundlichschen Formel

$$\ln \frac{x_\infty}{x_\infty - x} = kz$$

[1]) Zitiert nach Freundlich, Capillarchemie, S. 172.

[2]) Mit z sei die zur Adsorption der Menge x erforderliche Zeit bezeichnet.

enthaltene Konstante k berechnet. Wie die Tabelle XXIII zeigt, in der die Berechnung für den Einzelversuch 1 der Tabelle IV ausgeführt ist, ist die Übereinstimmung der beiden k-Werte eine befriedigende.

Tabelle XXIII.

z (in Tagen)	x	k
2	1,969	0,0634
15	6,595	0,0544
∞ (= 23)	7,781	—
	Im Mittel:	0,0589

Suchen wir uns nun die Differenz zwischen unserer Erklärung der Lipoidfärbung als Adsorptionsvorgang und der von Overton durch die Aufstellung des Prinzips der auswählenden Löslichkeit gegebenen, so finden wir sie in dem Umfange des gestellten Beweisthemas. Die Tatsache der ungleichen Verteilung in Wasser gelöster Substanzen zwischen diesem und den Lipoiden und die „Löslichkeit" der Lipoide in organischen Lösungsmitteln waren schon lange zuvor bekannt; so kam es, daß die zum Beweis gesetzte These Overtons, die Gültigkeit des Verteilungssatzes für die Farbstoffaufnahme, zugleich auch schon als Voraussetzung genommen wurde. Quantitativ sind alle Versuche Overtons nur insoweit, als bei einer einzigen Ausgangskonzentration der Quotient der Konzentrationen in den beiden Phasen (Wasser und Lipoid) bestimmt wird. Diesen Quotienten pflegt Overton als Verteilungsfaktor zu bezeichnen, doch hat dieser Faktor offensichtlich mit dem vom Henryschen Verteilungssatze verlangten so lange nichts zu tun, als nicht seine Konstanz für verschiedene Konzentrationen nachgewiesen ist. So kam das eigenartige Ergebnis zustande, daß der Schöpfer der Lipoidtheorie, d. h. der Theorie von der Parallelität zwischen der Passierungsfähigkeit der Stoffe in die Zelle und aus ihr heraus und ihrer Lipoidlöslichkeit, uns den Beweis dieser Lipoidlöslichkeit im Sinne des Henryschen Satzes für die Farbstoffe wie für alle anderen von ihm studierten Substanzen schuldiggeblieben ist.

Zur physikalischen Chemie der Lipoide. II.

Die Beziehungen der Lipoide zu anderen organischen Substanzen (Narkoticis, Hypnoticis u. ä.).

Von

Siegfried Loewe.

(Aus dem chemischen Laboratorium der psychiatrischen und Nervenklinik und dem physikalisch-chemischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 14. Mai 1912.)

Mit 8 Figuren im Text.

1. Lipoide und Hypnotika.

In der vorigen Mitteilung wurde gezeigt, daß die Annahme Overtons, die Farbstoffaufnahme durch Lipoide geschehe auf Grund ihrer Fähigkeit, als heterogenes Lösungsmittel zu fungieren, nach Maßgabe des Henryschen Verteilungssatzes, vermutlich nicht zutreffend ist. Diese eine Stütze der Overtonschen Theorie, der Beweis mit Hilfe der Farbstoffaufnahme, ist damit unzulänglich geworden. Die weitere Anwendung dieser Theorie auf die Aufnahme auch aller möglichen anderen Substanzen durch die lipoide Zellmembran ist nun von Overton gleichfalls nicht anders fundiert; auch ihr fehlt der Nachweis, daß die Aufnahme durch einen bei Änderung der Außenkonzentration konstanten Teilungskoeffizienten charakterisiert ist. Einen Versuch, die Unabhängigkeit des Verteilungsquotienten von der Konzentration zu zeigen, finden wir nur bei Hans Meyer[1]); ihm war es darum zu tun, eine Theorie der Wirkung der indifferenten Narkotika zu geben, in deren Mittelpunkt die Fähigkeit der Lipoide stand, als heterogenes Lösungsmittel gegenüber den „Alkoholnarkoticis“ zu fungieren.

[1]) l. c.

Auch hier findet sich die zu beweisende Lösefunktion der Lipoide bereits in der Voraussetzung. Es geht dies schon aus seinen Leitsätzen hervor: Läßt die zum Ausgangspunkt genommene Vorstellung, „daß die narkotische Wirkung von Chloroform usw., um es ganz allgemein auszudrücken, eine Funktion seiner Fettlöslichkeit (Affinität zu fettähnlichen Stoffen) ist", noch Zweifel darüber, ob unter dieser Affinität auch wirklich eine echte Lösung verstanden wird, so werden diese Zweifel doch völlig behoben durch die Thesen, die aus dieser Vorstellung heraus aufgestellt werden, nämlich:

„1. Alle zunächst chemisch indifferenten Stoffe, die für Fett und fettähnliche Körper löslich[1]) sind, müssen . . . narkotisch wirken.

2. Die Wirkung wird an denjenigen Zellen am ersten und stärksten hervortreten müssen, in deren Bau jene fettähnlichen Stoffe vorwalten . . .

3. Die verhältnismäßige Wirkungsstärke solcher Narkotika muß abhängig sein von ihrer mechanischen Affinität zu fettähnlichen Substanzen einerseits, zu den übrigen Körperbestandteilen, d. i. hauptsächlich Wasser, andererseits: mithin von dem Teilungskoeffizienten, der ihre Verteilung in Gemischen von Wasser und fettähnlichen Substanzen bestimmt."

Durch die Hervorhebung des Begriffes des Teilungskoeffizienten ist also sichergestellt, daß es sich bei der Beziehung von „Chloroform usw." zu den Lipoiden um eine Verteilung nach Maßgabe des Henrysatzes handeln soll.

In der Tat zielt auch der experimentelle Teil, der vorwiegend von Fritz Baum[2]) bearbeitet worden ist, auf die Bestimmung von solchen Teilungskoeffizienten ab[3]). Im Gegensatze zu Overton, der unter Betonung des Umstandes, daß bei höheren Konzentrationen Abweichungen von der Konstanz des Teilungskoeffizienten vorkommen, mit möglichst niedrigen Konzentrationen arbeitet, nimmt Baum als „abgebende Phase" eine meist gesättigte, wässerige Lösung des Dispergendums (Narkoticum). Auch Baum geht, sogar noch weitgehender als Overton, von der Voraussetzung aus, daß die Löslichkeit der Narkotica in Lipoiden — qualitativ wenigstens — der in Öl gleichgesetzt werden kann. Er bestimmt

[1]) Die gesperrten Wendungen sind im Original nicht hervorgehoben.

[2]) l. c.

[3]) Die soeben erschienene Untersuchung von Warburg und Wiesel (Arch. f. d. ges. Physiol. **144**, 465, 1912) ist leider erst während der Drucklegung unserer Mitteilungen in unsere Hände gelangt, so daß darauf leider nicht näher eingegangen werden kann. Sie scheint sich, soweit nicht gleichfalls der Begriff des Teilungskoeffizienten, wie bei Meyer-Overton, zu weitherzig gefaßt ist, mit unseren Ergebnissen zu berühren.

also die Verteilungsfaktoren der Narkotika zwischen Öl und Wasser, und zwar nach Schütteln der beiden Phasen mit einer Schüttelmaschine. Wie er angibt, ist bei kräftigem Schütteln schon nach 10 Minuten Gleichgewicht erreicht. Auch er erwähnt das Auftreten der zuweilen außerordentlich stabilen Emulsion, auf deren Gefahren schon früher (S. 155, vorige Mitteilung) hingewiesen wurde.

Von den durch Baum untersuchten Substanzen fällt nun eine große Reihe deswegen außer Betrachtungsmöglichkeit, weil Baum bei ihnen, ebenso wie Overton bei allen seinen Versuchen, den Teilungskoeffizienten nur aus dem Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen bei Verwendung von nur einer Ausgangskonzentration bestimmt hat; es besteht hier also deutlich die oben ausgeführte Insuffizienz des Beweises gegenüber dem Beweisthema; dies gilt für Methylurethan, tertiären Butylalkohol, Amylenhydrat, Monacetin, Diacetin, Triacetin, Bromalhydrat und Butylchloralhydrat, eigentlich wohl auch noch für Äthylurethan, bei dem das Verhältnis der geprüften Ausgangsvolumina beider Phasen in den zwei angestellten Versuchen (1 : 1 bzw. 5 : 6) zu wenig variiert. So bleiben noch fünf Narkotika übrig, für die Baum die Verteilung bei mehreren Konzentrationen gemessen hat. Die Ergebnisse dieser wenigen Versuche, das Zutreffen des Verteilungssatzes auch in bezug auf die Abhängigkeit von der Konzentration bzw. von dem Volumenverhältnis der beiden Solventien zu prüfen, sollen in der folgenden Tabelle zusammengestellt werden; dabei ist gleichzeitig neben dem von Baum nach der Verteilungsformel:

$$\frac{x}{m} = k' \frac{c}{v}$$

berechneten Verteilungsfaktor k' unter Zugrundelegung der Adsorptionsisotherme:

$$\frac{x}{m} = k c^{\frac{1}{n}}$$

der Exponentialfaktor $\frac{1}{n}$ und die Adsorptionskonstante k berechnet und verzeichnet (wobei in beiden Formeln m das Volumen der heterogenen Phase, Kubikzentimeter Öl, v das der wässerigen Phase, x die aufgenommene Menge, c die Endkonzentration in der wässerigen Phase bedeutet).

Aus äußeren Gründen sind die Zahlen für die Narkotika in den verschiedenen Versuchen verschieden, und zwar teils in Grammen, wie bei Baum, teils in Mol bzw. Millimol pro Liter berechnet, eine Inkonstanz, die ja, da innerhalb der einzelnen Versuchsreihen das gleiche Maßsystem beibehalten ist, ohne Bedeutung ist.

Tabelle XV.

Nr.		a	$\frac{x}{m}$	c	k'	$\frac{1}{n}$	k
1	Sulfonal	6,07	0,060	3,07	0,979	2,58	0,00326
		6,07	0,096	3,68	1,251		0,00325
2	Trional	2,050	0,03292	0,404	4,074	1,43	0,1202
		2,050	0,05800	0,600	4,833		0,1204
3	Tetronal	1,908	0,0344	0,462	3,756	1,915	1,4940
		1,908	0,0484	0,552	4,322		1,4970
4	Dimethylsulfomethan	6,695	0,0125	6,072	0,1028	0,911	0,0195
		3,347	0,0066	3,018	0,1091		0,0203
5	Chloralhydrat . . .	98,7	0,316	82,90	0,1904	0,826	0,00808
		49,3	0,175	40,55	0,2164		0,00810

Aus den Fig. 1 bis 3 sind gleichzeitig die $\frac{x/m}{c}$-Kurven und die $\frac{\lg x/m}{\lg c}$-Kurven zu ersehen.

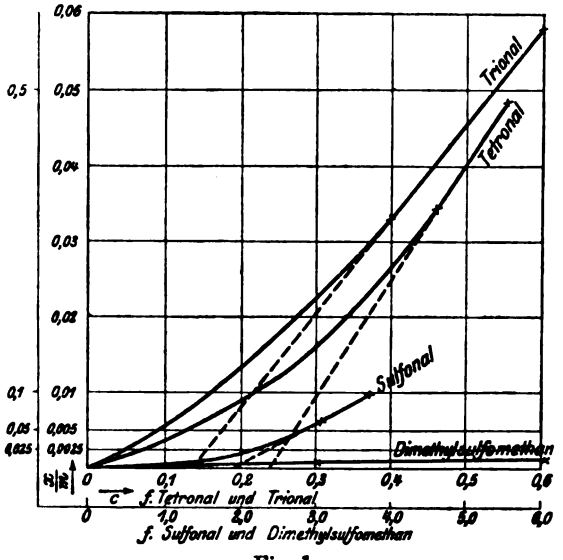


Fig. 1.

$$\frac{\text{Ordinate}}{\text{Abszisse}} = \frac{10}{1}.$$

Aus diesen Berechnungen ergeben sich für die Frage, ob die untersuchten fünf Narkotika nach dem Verteilungssatze durch Öl aufgenommen werden, folgende Gesichtspunkte:

1. Es muß vorweggenommen werden, daß zur sicheren Feststellung der Art der Abhängigkeit der Aufnahme von der

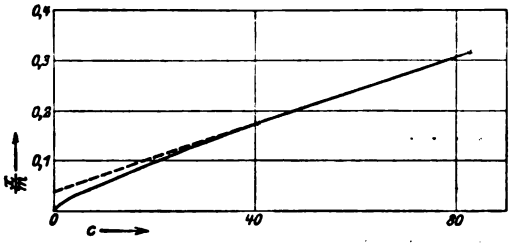


Fig. 2.

$$\frac{\text{Ordinate}}{\text{Abszisse}} = \frac{100}{1}.$$

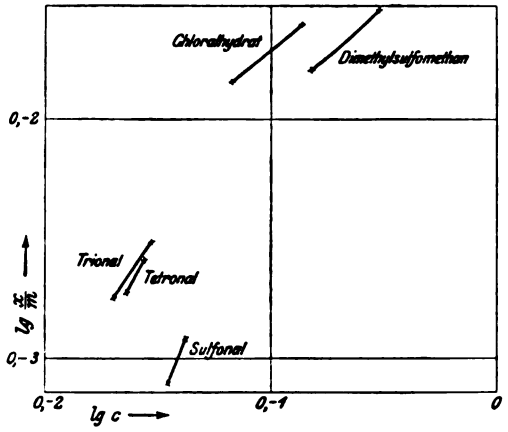


Fig. 3.

Menge der aufnehmenden Substanz oder von der Konzentration des Dispergendums die Bestimmung von nur 2 (bzw. 3, bei Einrechnung des 0-Punktes) Punkten der Kurve eigentlich ungenügend ist. Da aber diese Versuche Baums die einzigen sind, in denen durch Variation einer jener Variablen die strenge Gültigkeit des Verteilungssatzes zu beweisen versucht wurde, so muß man sich zunächst mit dieser Insuffizienz abfinden.

2. Die Teilungskoeffizienten, die Baum für die beiden ermittelten Punkte jeder geprüften Substanz berechnet, stimmen unter sich nie genau überein.

3. Betrachtet man die nach Maßgabe der Baumschen Zahlen konstruierten $\frac{x/m}{c}$- und $\frac{\lg x/m}{\lg c}$-Kurven, so geht die erstere dementsprechend nie durch den 0-Punkt, bzw. ist, bei dessen Einbeziehung in die Kurve, nie linear (Fig. 1 und 2), die letztere besitzt nie einen Neigungswinkel von 45°.

4. Der Exponentialfaktor der Kurven ist dementsprechend nie genau $= 1$, sondern weicht bald nach oben, bald nach unten ab.

Sieht man von den Kurven für Dimethylsulfomethan (und vielleicht auch für Chloralhydrat) ab, unter der Annahme, daß die Abweichungen durch die Versuchsfehlerbreite erklärt werden können, so bleibt doch für die übrigen Substanzen die sichere Feststellung übrig, daß die Forderungen des Henrysatzes, und zwar auch in der Nernstschen Modifikation, an ihnen nicht erfüllt sind. Ihre Aufnahme durch Olivenöl ist keine Verteilung. Freilich sind die $\frac{1}{n}$-Zahlen auch für eine normale Adsorption etwas auffällig. Es ist noch nicht ganz gesichert, inwieweit Kurven mit einem Exponentialfaktor von über 1 einfach als Adsorptionskurven aufgefaßt werden dürfen. Bedenkt man jedoch, daß solche Exponenten, wie schon früher erwähnt, doch mehrfach bei Prozessen gefunden worden sind, bei denen die Annahme einer Adsorption sehr nahe liegt, so ist jedenfalls die Annahme einer solchen für die Aufnahme der von Baum untersuchten Narkotika näherliegend als die einer Verteilung bzw. Lösung. Leider hat sich bisher keine Gelegenheit gefunden, diese Verhältnisse für die gleichen Narkotika und an reinen Lipoiden nachzuprüfen; die hier zu berichtenden Versuche in dieser Richtung beschränkten sich vielmehr auf einige Stichproben, die im folgenden wiedergegeben werden sollen.

2. Das Gleichgewicht in dem System: Cholesterin = wässerige Chloralhydratlösung.

Wegen der Löslichkeit des Chloralhydrats in organischen Lösungsmitteln mußte von der Unterbringung des Lipoids in einer zweiten organischen Phase, wie sie bei der Prüfung der Farbstoffaufnahme mit Vorteil geübt wurde, abgesehen werden.

Es zeigte sich bald, daß die meisten reinen Lipoide wegen ihrer guten (kolloiden) Dispergierbarkeit in Wasser der nachherigen Trennung von Adsorbens und wässeriger Phase große Schwierigkeiten in den Weg stellten. Es wurde daher für diesen vorläufigen Versuch dasjenige Lipoid gewählt, das die geringste Dispersionsaffinität gegen Wasser zeigt, von ihm daher auch leicht durch Filtration wieder zu trennen ist, freilich, wie sich bei den Farbstoffversuchen herausgestellt hat, auch in seinen Beziehungen zu „lipotropen" Substanzen am wenigsten Ähnlichkeit mit den übrigen Lipoiden zeigt.

Die Methoden Baums zur Bestimmung des Chloralhydrats erschienen zum Teil ihm selbst nicht ganz ausreichend. Ebenso versagte die von Seyde[1]) angegebene colorimetrische Methode zur Bestimmung von Chloroform und Chloralhydrat mit Hilfe von Resorcin in alkalischer Lösung für den vorliegenden Zweck vollständig. Es erschien daher der folgende Weg als der geeignetste:

Von der zu prüfenden Lösung wurden je nach der Konzentration 2 bis 5 ccm zu 100 bis 400 ccm Alk. abs. zugesetzt, einige Stücke metallischen Natriums hinzugegeben und am Rückflußkühler 5 Stunden auf dem Wasserbade gespalten. Dann wurde nach Verdünnen mit destilliertem Wasser die Chlorbestimmung nach Mohr ausgeführt.

Die Vollständigkeit der Aufspaltung erwies sich in folgendem Vergleichsversuch mit Chloroform:

Es wurden abgewogene Chloroformmengen unter Zugabe von je 5 ccm Wasser 3 bzw. 8 Stunden nach der eben angeführten Methode gespalten; die Titration ergab:

Chloroformmenge g	Dauer der Spaltung Stunden	Verbrauchte Silberlösung[2]) ccm	Cl gef.	Cl ber.
0,0863	8	12,71	0,0770	0,0769
0,1279	3	19,04	0,1154	0,1149

Versuch 1.

Der Versuch wurde so angeordnet, daß je 0,5 g Cholesterin, fein verrieben, in je 10 ccm einer wässerigen Chloralhydratlösung von wechselnder Konzentration suspendiert wurden. Nach dreitägigem Stehen, während dessen häufig umgeschüttelt wurde, wurde rasch von dem Cholesterin abfiltriert und im Filtrat die Chloralhydratbestimmung vorgenommen. Die Kontrollbestimmungen wurden in den drei Ausgangslösungen des

[1]) A. Seyde, Chloroformbestimmung in Leichenteilen. Zeitschr. f. öff. Chem. **3**, 333.

[2]) = 29,050 g $AgNO_3$ im Liter.

Chloralhydrats vorgenommen, die unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Cholesterinzusatz, gestanden hatten.

Tabelle XVI.

Nr.	a millimol	$\frac{x}{m}$ $\frac{\text{millimol}}{g}$	c millimol	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k $\left(\text{für } \frac{1}{n} = 0{,}74\right)$
1	246,72	4,78	244,38	0,020	0,06	0,014
2	122,14	4,99	119,65	0,042	1,54	0,024
3	58,00	1,60	57,20	0,028	0,75	0,013
			Im Mittel	0,023	0,74	0,017

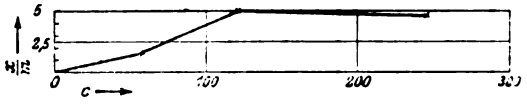


Fig. 4.

$$\frac{\text{Ordinate}}{\text{Abszisse}} = \frac{10}{1}.$$

Die Aufnahme ist also sehr gering, so gering, daß sich über die Kurvenform nichts Bestimmtes aussagen läßt. Soweit sich bei der geringen Differenz zwischen Kontroll- und Versuchszahlen mit aller Vorsicht überhaupt etwas vermuten läßt, ist es, daß doch eher eine Lösung als eine Adsorption vorliegt. Doch möchte man lieber von einer genaueren Deutung des Versuches abstehen und sich damit begnügen, auch für das Chloralhydrat den Befund mit Methylenblau bestätigt zu sehen, daß nämlich das Aufnahmevermögen des Cholesterins ein sehr geringes ist und vielleicht auch in bezug auf die Narkotika gegenüber dem Bindungsvermögen der übrigen Lipoide völlig verschwindet.

3. Das Gleichgewicht in dem System: Weiße Hirnsubstanz = wässerige Chloroformlösung.

Wegen der besseren Wiederabtrennbarkeit von der wässerigen Lösung wurde in diesem wie auch den beiden folgenden Versuchen an Stelle reiner Lipoide Gehirnsubstanz als Adsorbens verwendet; einmal ist ja dieses Organ durch seinen hohen Lipoid-

gehalt charakterisiert[1]), außerdem aber war es auch nicht uninteressant, zu sehen, wie sich dasjenige Organ, an dem das Narkoticum in vivo die augenfälligste Wirkung zeigt, sich in vitro verhielte.

Versuch 2.

Es wurden je 0,4 g trockene, weiße Gehirnsubstanz, nach dem an anderem Orte beschriebenen Verfahren isoliert[1]), zu je 100 ccm wässeriger Chloroformlösung von dreifach verschiedener Konzentration zugesetzt und unter zeitweisem Schütteln stehen gelassen; nach 20 Stunden wurde filtriert und im Filtrat das Chloroform nach der gleichen Methode der Chlorbestimmung wie bei dem Chloralhydratversuch bestimmt.

Tabelle XVII.

Nr.	a millimol	$\frac{x}{m}$ millimol/g gef.	ber.	c millimol	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k $\left(\text{für } \frac{1}{n} = 0{,}27\right)$
1	543,8	49,0	65	347,7	0,141	0,07	10,1
2	271,9	44,7	44	93,2	0,479	0,48	13,1
3	135,9	26,3	20	30,9	0,852	0,26	10,4
					Im Mittel	0,27	11,2

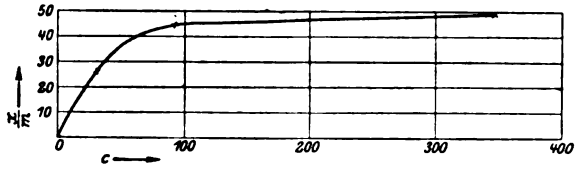


Fig. 5.

Es ist also auch für die Chloroformaufnahme die Annahme einer Verteilung nicht statthaft, dagegen eine Adsorption, wenn auch die berechneten Adsorptionskonstanten nicht immer gut übereinstimmen, sehr wahrscheinlich; freilich ist man, solange statt der reinen Lipoide Gehirnsubstanz verwendet wird, nie

[1]) Wie weitgehend das physikalisch-chemische Verhalten der Gehirnsubstanz von ihrem Lipoidgehalt bedingt ist, erweisen z. B. die Untersuchungen von J. Bauer (Arb. a. d. Obersteinerschen Inst., Wien 1912), der zeigen konnte, daß die Quellung der Hirnsubstanz den Quellungsgesetzen der Lipoide unterliegt.

[1]) S. Loewe, Über die Trennung weißer und grauer Hirnsubstanz. Zeitschr. f. biol. Technik u. Methodik 2, 177, 1911.

ganz gegen den Einwand gesichert, es könne die Adsorption durch andere als lipoide Substanzen bedingt sein.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß bereits Herzog und Betzel[1]) einen gleichen Mechanismus der Chloroformbindung für Hefezellen gefunden haben. Auch ihre Kurven stellen Adsorptionskurven dar. Sie bestimmten das Chloroform nach Nicloux[2]); diese Methode entspricht der in unseren Versuchen angewandten insoweit, als ebenfalls eine Spaltung des Chloroforms in alkoholischer Lösung mit an-

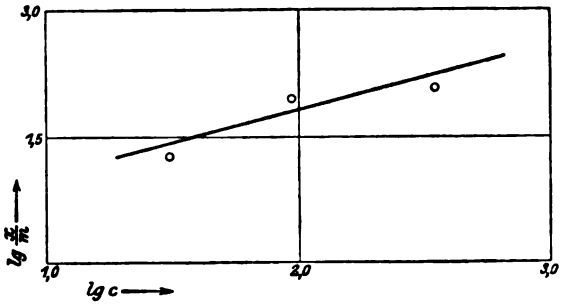


Fig. 6.

schließender Titration als Chlorsilber vorgenommen wird. Nur haben die Autoren durch die umständliche Destillation nach Nicloux die Anwesenheit der geringen Mengen Wasser, die in unseren Versuchen nicht entfernt wurden, vermeiden zu müssen geglaubt. Ein anderer Punkt, auf den die Autoren in ihrer leider erst nach Beendigung unserer Untersuchungen zu unserer Kenntnis gelangten Publikation aufmerksam machen, scheint wesentlich beachtenswerter; sie machten nämlich die Erfahrung, daß die beim Umfüllen des wässerigen Chloroforms eintretenden Verluste unter Umständen nicht vernachlässigt werden dürfen. Die Werte der von Herzog und Betzel ermittelten Adsorptionskonstanten für Hefe und Chloroform belaufen sich auf 1,15 bzw. 1,42 für $\frac{1}{n}$ und 1,528 bzw. 5,37 bzw. 3,75 für k. Bezüglich des atypischen Wertes von $\frac{1}{n}$ berufen sich die Autoren auf die Feststellungen von Freundlich u. a.

[1]) Herzog und Betzel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 309, 1910; 74, 221, 1911.

[2]) Nicloux, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 142, 163.

Übrigens dürften auch schon die ersten Untersuchungen Pohls[1]) über die Aufnahme von Chloroform durch rote Blutkörperchen und Gehirn hierher gehören; der von ihm angezogene, von Hofmeister[2]) geschaffene Begriff der „mechanischen Affinität" stellt wohl nichts anderes als eine bemerkenswert frühe Vorahnung des heutigen Adsorptionsbegriffes dar.

4. Das Gleichgewicht in dem System: Weiße Hirnsubstanz = wässerige Nicotinlösung.

Für das Nicotin hielt schon Overton[3]) „einen Wirkungsmechanismus", wie er ihn sich für die indifferenten Narkotika dachte, „für ausgeschlossen". Er betont in diesem Zusammenhang zunächst den ungünstigen Teilungskoeffizienten des Nicotins für Lipoide, da es sich „in jedem Verhältnis in Wasser und in ca. 4 Teilen Olivenöl" löse. Doch findet er eine Ähnlichkeit zwischen den indifferenten Narkotika einerseits und den stärker basisch reagierenden Verbindungen andererseits, zu denen er das Nicotin rechnet, darin, daß es sich bei beiden Gruppen um Verbindungen handelt, die in Cholesterin-Lecithingemischen mehr oder weniger leicht löslich sind. Der Unterschied scheint ihm nur in der Geschwindigkeit der Wiederabgabe zu bestehen, die bei den basischen Körpern durch die Bildung von — allerdings dissoziierbaren — Eiweißverbindungen verzögert wird.

Aus dem bereits auseinandergesetzten Grunde beschränkte ich mich auch für das Nicotin auf die Verwendung von Gehirnsubstanz an Stelle der reinen Lipoide; dagegen wurde ein Vergleich zwischen der Aufnahme durch weiße und graue Substanz versucht.

Versuch 3.

Je 10 g getrocknete weiße Hirnsubstanz wurden zu je 150 ccm wässeriger Lösung von (freiem) reinem Nicotin (Nicotin. puriss. E. Merck) von verschiedener Konzentration zugesetzt; nach 10tägigem Stehen, wobei häufig vorsichtig geschüttelt wurde, filtrierte man von der Gehirnsubstanz ab und bestimmte die in Lösung gebliebene Nicotinmenge nach Kißling durch Titration mit $^n/_{10}$-H_2SO_4 gegen Rosolsäure.

---

[1]) J. Pohl, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 28, 239, 1891.
[2]) F. Hofmeister, ebenda, 28, 210, 1891.
[3]) Studien über die Narkose, S. 169ff.

Tabelle XVIII.

Nummer	a millimol	$\frac{x}{m}$ $\frac{\text{millimol}}{\text{g}}$	c millimol	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k (für $\frac{1}{n} = 0{,}14$)
1	366,4	5,2	314,2	0,017	aus 1 u. 2: 0,13	2,33
2	248,2	4,9	199,0	0,025	„ 1 „ 4: 0,15	2,35
3	68,5	3,7	31,5	0,117	„ 2 „ 4: 0,15	2,28

5. Das Gleichgewicht in dem System: Graue Hirnsubstanz = wässerige Nicotinlösung.

Versuch 4.

Die Versuchsanordnung war im wesentlichen die gleiche wie im vorhergehenden Versuch.

Graue getrocknete Hirnsubstanz: je 7 g.

Volumen der wässerigen Nicotinlösungen: je 150 ccm.

Versuchsdauer: 13 Tage.

Titration nach Kißling.

Tabelle XIX.

Nummer	a millimol	$\frac{x}{m}$ $\frac{\text{millimol}}{\text{g}}$	c millimol	$\frac{x/m}{c}$	$\frac{1}{n}$	k (für $\frac{1}{n} = 0{,}4$)
1	342,2	10,6	267,9	0,040	aus 1 u. 2: 0,77 „ 1 „ 3: 0,37	1,13
2	228,6	7,6	175,1	0,044	„ 1 „ 4: 0,38 „ 2 „ 3: 0,18	0,97
3	115,5	6,5	70,0	0,093	„ 2 „ 4: 0,29 „ 3 „ 4: 0,41	1,19
4	59,0	4,5	27,8	0,160		1,18
					Im Mittel: 0,40	1,12

Die erhaltenen Kurven sind in beiden Fällen Adsorptionskurven, deren Konstanten allen Anforderungen an normale Adsorptionskonstanten entsprechen. Die Bestimmungsmethode ist insofern nicht besonders geeignet, als sie nur den nicht an Säure gebundenen, in Lösung gebliebenen Teil des Nicotins anzeigt. Inwieweit der Prozeß daher auf andere Weise erklärt werden könnte, soll hier nicht erörtert werden. Es kommt vor allem darauf an, zu zeigen, daß sich das angebliche Lösungsvermögen der Lipoide nirgends erkennen läßt. Besonders interessant ist für diesen Zweck der Vergleich der beiden ungleich

lipoidhaltigen Hirnteile; die weiße Substanz, die doch annähernd doppelt so lipoidreich ist als die graue, bleibt gerade in den höheren Konzentrationen, wo ihr überlegenes „Lösungsvermögen" besonders stark hervortreten müßte, hinter der grauen Substanz

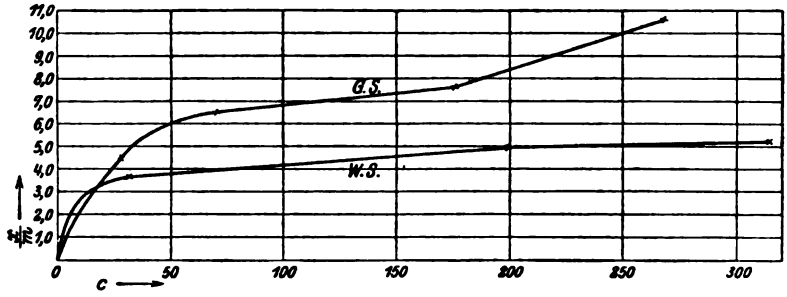


Fig. 7.

$$\frac{\text{Ordinate}}{\text{Abszisse}} = \frac{10}{1}.$$

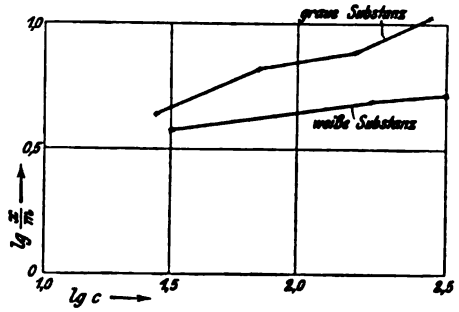


Fig. 8.

immer mehr zurück. Bei kleinen Konzentrationen, wie sie im Tierkörper vorwiegend vorkommen werden, ist freilich das Bindungsvermögen der weißen Substanz das größere; dies ist aus der stärkeren Krümmung ihrer Adsorptionskurve und dem dementsprechend niedrigeren $\frac{1}{n}$ verständlich.

6. Das Gleichgewicht in dem System: Lipoid = wässerige Tetanustoxinlösung.

An der Hand der bei diesen Untersuchungen gesammelten Erfahrungen soll hier noch einmal kurz auf die Frage der

Tetanustoxinbindung durch Gehirnsubstanz eingegangen werden, die in einer früheren Untersuchung[1]) betrachtet worden war. Es gehört diese Frage in den Rahmen dieses Abschnittes, da es sich dabei auch um die „Verteilung" einer organischen Substanz zwischen Lipoiden und Wasser handelt. In der genannten Arbeit, in der nach dem gleichen Prinzip wie in diesen Versuchen Konzentrationskurven aufgenommen waren, ist die Möglichkeit einer Adsorption als Grundlage der Toxinbindung bereits ins Auge gefaßt worden. Allerdings neigte ich — die Unmöglichkeit genauer quantitativer Bestimmung ließ beide Deutungen offen — damals noch mehr der Auffassung der gefundenen Kurven als Verteilungskurven zu. Am meisten bestimmte zu dieser Deutung der Permeabilitätsversuch, der in analoger Weise wie die Prüfung der Farbstoffdurchlässigkeit in der vorigen Arbeit (Z. physik. Chemie d. Lipoide I) an einem über toxinhaltige Gelatine geschichteten Chloroform-Lipoiddiaphragma angestellt wurde; es hatte sich ergeben, daß das Toxin in der Tat in die auf der anderen Seite des Diaphragmas befindliche Kochsalzlösung hinüberwanderte. Nachdem sich nunmehr aber die Durchlässigkeit solcher Diaphragmen auch für solche Stoffe erwiesen hat, die durch das darin kolloid enthaltene Lipoid sicher nicht gelöst, sondern adsorbiert werden, steht einer Auffassung der Tetanustoxinbindungskurven als Adsorptionskurven dieser Diaphragmenversuch nicht im Wege. Andererseits wurden damals einige Punkte außer acht gelassen, die schon für die Annahme, es handle sich um den Anfangsteil von Adsorptionskurven, sprechen. Zunächst einmal zeigt der Schlußteil der Kurve für Rohphrenosin (l. c., S. 503, Fig. 3) doch eine beginnende Näherung an die Abszissenachse. Dann aber muß vor allem eine Überlegung zu der Annahme einer Adsorption führen: das Tetanustoxin ist nämlich bekanntlich in Wasser gar nicht echt gelöst, sondern nur kolloid; selbst wenn also auf einem anderen Wege sichergestellt werden könnte, daß das Toxin im Lipoid echt gelöst wäre, so könnte doch für eine Verteilung zwischen Lipoid und Wasser der Henry-Satz nicht maßgebend sein. Es ist also mit großer Wahrscheinlichkeit auch die Aufnahme des Tetanustoxins durch die Lipoide ein Adsorptionsvorgang.

[1]) Diese Zeitschr. **34**, 507 ff., 1911.

7. Zusammenfassung.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes lassen sich trotz der unzureichenden Zahl von Versuchen dahin zusammenfassen:

1. Aus den Ermittlungen Baums geht hervor, daß die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von Sulfonal, Trional und Tetronal sicher keinen Beweis für die Gültigkeit des Verteilungssatzes bei der Aufnahme der Narkotika durch Lipoide (bzw. Olivenöl) bildet. Der Vorgang ist vielmehr eine Adsorption, deren Exponentialfaktor allerdings größer als 1 ist. Auch für die Aufnahme des Chloralhydrats durch Olivenöl verläuft die Kurve nicht linear, ihr Exponentialfaktor ist kleiner als 1. Es bleibt also von den durch Baum auf die Art der Konzentrationsabhängigkeit geprüften Narkoticis höchstens das Dimethylsulfomethan als Lösungsobjekt für Olivenöl übrig.

2. Die Aufnahme des Chloralhydrats durch Cholesterin ist so gering, daß dieses „Lipoid" bei einer ev. Bindung im Organismus keine Rolle spielen kann. Der Mechanismus der Aufnahme läßt sich aus diesem Grunde nicht sicher als Verteilung feststellen oder widerlegen.

3. Die Aufnahme von Chloroform durch weiße Hirnsubstanz ist eine adsorptive.

4. Das gleiche gilt für die Aufnahme von Nicotin sowohl durch weiße wie durch graue Hirnsubstanz. Bei hohen Konzentrationen wird mehr Nicotin durch die graue, bei den praktisch in Frage kommenden niedrigen Konzentrationen mehr durch die weiße Substanz adsorbiert.

5. Auch die „Bindung" des Tetanustoxins durch Lipoide und durch Gehirnsubstanz ist jetzt als Adsorption zu deuten.

Zur physikalischen Chemie der Lipoide. III.

Diffusion in Lipoiden.

Von

Siegfried Loewe.

(Aus dem chemischen Laboratorium der psychiatrischen und Nervenklinik und dem physikalisch-chemischen Institut der Universität Leipzig.)

In Übereinstimmung mit der Feststellung der bisherigen Abschnitte, daß sich bisher kein Beweis für die Funktion der Lipoide als echte Lösungsmittel hat erbringen lassen, steht das Ergebnis von Diffusionsversuchen. Wenn ihre Zahl auch gering ist, so betreffen sie doch Substanzen, von denen eine Löslichkeit und damit auch eine Diffusionsfähigkeit in Lipoiden am ehesten zu erwarten wäre.

Diffusion von Nicotin in Kephalin.

Versuch 1.

Aus einem nicht ganz reinen und trockenen, infolgedessen knetbaren Kephalin aus menschlichem Gehirn wurde in das untere Ende eines kurzen Glasrohres von etwa 6 mm Durchmesser ein dieses in einer Ausdehnung von etwa 3 mm verstopfender Pfropf eingeknetet. Das Glasrohr wurde durch einen Gummistopfen in ein kleines, bis zum Rande mit rosolsäurehaltigem Wasser gefülltes Fläschchen eingeführt, dann über dem Kephalinpfropf mit reinem Nicotin überschichtet und gleichfalls verschlossen. Diese Anordnung stand Monate hindurch, ohne daß sich ein Farbenumschlag in der Rosolsäurelösung nachweisen ließ; es vermochte also in dieser ganzen Zeit das Nicotin nicht durch die 3 mm dicke Schicht von Lipoid hindurchzudiffundieren.

Diffusion von Methylenblau in Lipoiden.

Versuch 2.

Ein bei 37° zähflüssiges Phosphatidgemisch wurde in Röhrchen von etwa 2 mm Lumen aufgesogen; es wurde dann durch Kneten ein Gemisch der gleichen Lipoide mit Methylenblau hergestellt und dieses

so in die Röhrchen eingebracht, daß es in unmittelbarer Berührung mit der farbstofffreien Lipoidsäule war. Auch nach $1^1/_2$ Jahren ließ sich noch keine Verschiebung der Grenze der beiden Säulen, also keine Diffusion in das Lipoid feststellen. Dabei färbte sich das gleiche Phosphatidgemisch, wenn es in chloroformiger Lösung mit Methylenblau in Berührung gebracht wurde, intensiv und bleibend.

Versuch 3.

In eine durch Längsspaltung eines graduierten Röhrchens hergestellte Rinne mit Millimeterteilung wurde bis zu einer bestimmten Marke von dem gleichen Phosphatidgemisch wie im vorigen Versuch, daneben das mit Farbstoff durchmengte Lipoid eingeknetet. Das Ganze kam in einen Thermostaten von 37°. Auch hier zeigte sich während $1^1/_2$ Jahren keine Verschiebung der Grenze zwischen gefärbtem und ungefärbtem Teil.

Es diffundiert also weder Farbstoff noch auch mit Farbstoff beladenes Lipoid in das ungefärbte Lipoid hinein.

Vergleicht man mit dieser Diffusionsunfähigkeit die leichte Durchwanderungsfähigkeit der gleichen Stoffe durch dieselben Lipoide, wenn diese in kolloider Lösung sich in organischen Lösungsmitteln befinden, so wird ersichtlich, daß die „Diffusions"-fähigkeit in Lipoiden nur scheinbar ist, und daß sie abhängig ist von dem Grade der Beweglichkeit der mit Farbstoff adsorptiv beladenen Lipoidteilchen.

Zur physikalischen Chemie der Lipoide. IV.

Die Eigenschaften von Lipoidlösungen in organischem Lösungsmittel.

Von

Siegfried Loewe.

(Aus dem chemischen Laboratorium der psychiatrischen und Nervenklinik und dem physikalisch-chemischen Institut der Universität Leipzig.)

Einigen Aufschluß über die Art der Lösungsbeziehungen der Lipoide zu ihren organischen Lösungsmitteln gaben schon unsere Versuche über die Art der Farbstoffbindung durch die Lipoide. Es hatte sich dort gezeigt, daß die zur Untersuchung herangezogenen Lipoide und Lipoidgemische von dem Chloroform, dem dort zur Prüfung herangezogenen Lösungsmittel, nur kolloid gelöst werden. Es erschien nun von Wichtigkeit, die auf diesem Wege ermittelte Beschaffenheit der Lipoidlösungen in organischem Lösungsmittel näher zu betrachten und mit den verfügbaren physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden auch unmittelbar zu studieren.

Wenn sich auch die Feststellung der Kolloidnatur der Lipoide bisher nirgends erwähnt findet, so erscheint es doch angebracht, zunächst an einige Tatsachen zu erinnern, aus denen, für einzelne Lipoide zum mindesten, schon lange auf die lockere Art ihrer Beziehungen zu organischen Lösungsmitteln hätte geschlossen werden können.

Schon Vauquelin[1]) verglich den Absatz beim Einengen alkoholischen Gehirnextrakts mit einer Gummilösung. Couerbe[2]) erwähnt unter seinen Gehirn„edukten“ „ein gelbes, elastisches

[1]) Ann. du Mus. d. Hist. Nat. **1811**, 212.

[2]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **1840**, 974.

Fett", das er „Cephalote" nannte. Gobley spricht von einer „klebrigen Materie"[1]).

Unbeachtet, obwohl ein bedeutsamer Hinweis auf die Unfähigkeit der Lipoide, mit den organischen Extrahenten in echte Lösungsbeziehungen zu treten, blieb ferner ein anderer Umstand, der häufig genug erwähnt wird, nämlich die Nichtextrahierbarkeit mancher Lipoide in nassem oder, wie sich Thudichum ausdrückt, „hydratiertem" Zustande durch Äther, obwohl sie sich nach der „Dehydratisierung" leicht darin lösen[2]).

Hierher gehört ferner, daß Metallsalzfällungen der Lipoide aus organischem Lösungsmittel oft durch Dialyse wieder vom Metall befreit werden können[3]), so z. B. die Chlorcadmiumfällungen des Amidomyelins, des Paramyelins, des Lecithins, des Kephalins[4]) u. a.; wie das oft wohl rein adsorptive Festhalten dieser Substanzen dürfte sich auch die Fähigkeit der Lipoide erklären, Fermente, ja sogar Eiweißkörper in ein organisches Lösungsmittel hineinzubringen.

Vom Kephalin im besonderen wird stets die Opalescenz und Fluorescenz seiner Lösungen in organischen Lösungsmitteln beschrieben; Thudichum erwähnt seine Unfähigkeit, aus Äther zu krystallisieren und beschreibt dabei[4]), daß die ätherische Lösung „bei tiefen Kältegraden fest wird". Es ist das ebenso wahrscheinlich eine Gelbildung, wie die Alkoholfällung des Kephalins eine kolloide Zustandsänderung sein dürfte.

Eine ähnliche Kolloiderscheinung, die Quellung einer „Gelatine" mit organischem „Lösungsmittel", teilt Thudichum (l. c., S. 157) vom Myelin mit: „wird es ... mit Äther gewaschen, oder gepreßt und dann getrocknet, so wird es zum Teil opalin, durchscheinend, läßt sich wie Nußkern schneiden ..."

---

[1]) Journ. de Pharm. et d. Chim. 1846 (zit. nach Thudichum).

[2]) Thudichum sagt hiervon z. B.: „Es ist eine merkwürdige Eigenschaft der Phosphatide, sich in wassergequollenem, kolloidalem Zustand in Äther nicht zu lösen und damit keine Berührung anzunehmen." Doch dachte er nicht daran, daß dann auch der Äther kein echtes Lösungsmittel für diese Phosphatide sein kann, da es ihm doch sonst gelingen müßte, auch die in Wasser nur kolloid gelösten Stoffe in Lösung zu bringen.

[3]) Thudichum, l. c., S. 91ff.

[4]) Ebenda S. 133.

Die gleiche Quellbarkeit in Äther zeigt das Kerasin, das nach Thudichum darin „aufschwillt", ohne in der Kälte oder Wärme dabei in Lösung zu gehen.

Aus eigener Erfahrung kann hier die Beobachtung angefügt werden, daß Cerebrosidlösungen in Chloroform beim Einengen meist eine voluminöse Gallerte bilden, die das Lösungsmittel lange und auch bei höheren Temperaturen festhält.

Auf der Kolloidnatur einzelner oder aller Komponenten beruht jedenfalls zum Teil auch die Neigung der Lipoide, aus organischen Lösungsmitteln in Halb-, Sphäro- oder Mischkrystallen sich abzuscheiden, die Fähigkeit des einen Lipoids, ein anderes in einem Lösungsmittel, in dem dieses in reinem Zustand unlöslich ist, in Lösung zu erhalten, wie überhaupt alle die so unerfreulichen und häufigen Schwierigkeiten, welche sich dem in den Weg stellen, der Lipoidgemische zu trennen versucht. Durch die Erkenntnis der Kolloidnatur der Lipoide auch im organischen Lösungsmittel erscheinen umgekehrt auch alle diese Isolierungsmethoden in einem neuen und für die Weiterbildung der Trennungsmethoden voraussichtlich nicht ganz bedeutungslosen Lichte.

Vielleicht sollte übrigens auch das hohe Molekulargewicht der Lipoide, das abgesehen vom Cholesterin doch meist über 800 liegt, bereits auf die Vermutung gebracht haben, daß deren Lösungen schon aus diesem Grunde möglicherweise nicht homogen seien.

1. Beeinflussung der Oberflächenspannung.

Zur Bestimmung der Beeinflussung der Oberflächenspannung (σ) wurde die Methode der Steighöhenmessung verwendet. Da alle Versuche in dem gleichen Apparat vorgenommen wurden, so erübrigt sich eine Berechnung des Wertes von σ selbst; es werden daher die unter diesen Bedingungen unmittelbar miteinander vergleichbaren Werte der Steighöhenänderung in der angewandten Capillare angegeben. Als Lösungsmittel diente Chloroform, dessen Steighöhe 24 betrug[1]).

[1]) Das σ des Chloroforms beträgt nach Magie (zit. nach Freundlich) 26, gegenüber einem σ von 73 des Wassers.

Tabelle XX.

	c		$\Delta\sigma$	
	Gew.-%	$\frac{\text{mol}}{\text{Liter}}$	abs.	%
Cholesterin	8,6	0,22	+ 0,94	+ 3,89
	2,3	0,06	+ 0,11	+ 0,45
Kephalin	4,4	0,06	— 1,22	— 5,05
	1,1	0,014	— 0,26	— 1,06
Lecithin (Merck)	4,7	0,06	— 0,06	— 0,23
	1,2	0,015	— 0,12	— 0,51
Phrenosin	kalt gesättigt	0,0007	— 0,96	— 3,94
Myelin	0,05	—	— 0,52	— 2,10

Welches die Oberflächenspannung der reinen Lipoide ist, und ob diese größer oder kleiner als die des reinen Chloroforms ist, wissen wir nicht; es ist daher nicht vorauszusagen, in welcher Richtung diese Stoffe die Oberflächenspannung des reinen Chloroforms beeinflussen müßten, falls sie in diesem echt gelöst wären. Dagegen wissen wir, daß Benzoesäure, Campher, Naphthalin, Anilin, welche vermutlich echt gelöst sind, die Oberflächenspannung ihres organischen Lösungsmittels (z. B. des Chloroforms) ebenso gelinde erhöhen, wie die anorganischen Salze die des reinen Wassers [Jäger[1])]. Noch weniger ist von dem Einfluß der Kolloide auf die Oberflächenspannung eines organischen Dispersionsmittels bekannt. In wässerigem Dispersionsmittel unterscheiden sich bekanntlich „Suspensions"- und „Emulsions"-Kolloide hinsichtlich der Beeinflussung der Oberflächenspannung; während die ersteren die Oberflächenspannung anscheinend gänzlich unbeeinflußt lassen, erniedrigen die letzteren sie oft wesentlich. Zu den vielen bekannten Beispielen für diese Erscheinung soll in diesem Zusammenhang das bei Gelegenheit unserer Versuche ermittelte $\Delta\sigma$ für Kephalin hinzugefügt werden; eine 0,2 %ige (= 0,0025 molare) wässerige Kephalinlösung erniedrigte die Oberflächenspannung des reinen Wassers bereits um 23,5 %.

Aus diesen Ausführungen geht hervor, daß aus dem Einfluß auf die Oberflächenspannung des organischen Lösungsmittels allein noch kein bindender Schluß auf den Dispersitätsgrad der Lipoidlösungen gezogen werden kann. Doch zeigen

[1]) Zit. nach Freundlich.

unsere Messungen wiederum einen grundsätzlichen Unterschied zwischen dem Cholesterin, das die Oberflächenspannung des Chloroforms nicht unwesentlich erhöht, gegenüber allen anderen geprüften Lipoiden, welche das σ mehr oder weniger stark herabsetzen, so wie dies die Emulsionskolloide in wässerigem Dispersionsmittel zu tun pflegen.

2. Beeinflussung des Siedepunktes.

Die Bestimmung des Siedepunktes von Lipoidlösungen wurde dadurch zu einer genaueren Bestimmung des Dispersitätsgrades als alleiniges Mittel ungeeignet, weil die Lipoidlösungen außerordentlich stark schäumen, was ja freilich an sich schon ein Hinweis auf ihre Kolloidnatur ist.

Zur Untersuchung wurden verwendet Chloroformlösungen von Kephalin, Lecithin, Cerebrosiden sowie Chloroformextrakte aus Gehirnsubstanz, außerdem chloroformige Cholesterinlösungen. Leider fehlen die genauen zahlenmäßigen Notizen über die Befunde.

Das ein Abstehen von diesen Messungen veranlassende Endergebnis war jedenfalls, daß zwar die Cholesterinlösungen, die kein auffallendes Schäumen zeigten, eine wesentliche Siedepunktserhöhung gegenüber dem reinen Chloroform zeigten, daß aber alle übrigen Lipoide und Lipoidgemische in Chloroformlösungen unter starkem Schäumen nicht nur keine Erhöhung, sondern vielmehr eine Erniedrigung des Siedepunktes bewirkten. Auch auf diesem, sonst wenig verwertbaren Wege erweist sich also ein Gegensatz des Cholesterins gegenüber den übrigen Lipoiden.

3. Beeinflussung des Dampfdrucks.

Erst die Dampfdruckbestimmungen ermöglichten eine genauere Betrachtung der Beziehungen zwischen Lipoiden und ihrem organischen Lösungsmittel. Auch hier, anfangs in langen Fehlversuchen, erwies sich die Unverwendbarkeit zahlreicher Methoden, die Herr Professor Drucker in liebenswürdigen und dankenswerten Bemühungen ersann, bis sich schließlich die mikroskopische Methode von Barger[1]) als die zuverlässigste empfahl.

[1]) G. Barger, A microscopical method of determining molecular weights. Transact. of the Chemical Soc. 84, 286, 1904. — G. Barger and A. J. Ewins, Application of the microscopic. method usw. Ebenda, 87, 1756, 1905.

Dieses geistreiche Verfahren beruht auf der Größenveränderung von zwei im gleichen Gasraum befindlichen Tropfen, die im gleichen Lösungsmittel Substanzen in verschiedener molarer Konzentration gelöst enthalten. Es stellt also eine vergleichende Methode dar und ist als solche weitgehend unabhängig von Änderungen der äußeren Versuchsbedingungen, besonders Temperaturschwankungen zu gestalten.

Praktisch gestaltet sich die Anwendung der Bargerschen Methode, die, soviel ich sehe, bei uns bedauerlicherweise wenig bekannt geworden ist, obwohl sie sich wegen ihrer Einfachheit gerade dem Biologen besonders empfiehlt, für den vorliegenden Zweck folgendermaßen:

Als Vergleichslösung dient die Lösung einer sicher molardispersen Substanz im gleichen Lösungsmittel wie die zu prüfende Substanz; die Konzentration dieser Vergleichslösung muß genau bekannt sein. Von der zu untersuchenden Substanz wird eine bekannte Menge in einem bekannten Volumen Lösungsmittel gelöst. Dann werden in kleinen Capillaren abwechselnd Tropfen der Vergleichslösung und der zu prüfenden Lösung aneinandergereiht, die Röhrchen an beiden Enden zugeschmolzen oder -gesiegelt, mit dickem Kanadabalsam oder Gummibändern auf Objektträgern befestigt und in ein Wasserbad von beliebiger, je nach dem Siedepunkt des Lösungsmittels zu bemessender Temperatur gebracht. Mit Hilfe eines Meßobjektivs oder -okulars wird nun die anfängliche Größe der einzelnen Tropfen und deren Veränderung nach einer beliebigen Zeit unter dem Mikroskop gemessen; die Tropfen derjenigen Lösung, die den geringeren Dampfdruck, also die höhere molekulare Konzentration besitzt, nehmen zu. In Reihenversuchen, in denen die Konzentration der Vergleichslösung oder der zu prüfenden Lösung in bekannter Weise variiert wird, läßt sich diejenige Konzentration ermitteln, bei der die Tropfengröße genau gleichbleibt, bzw. lassen sich diejenigen beiden Konzentrationen finden, zwischen denen der Umschlag von einer Zunahme zu einer Abnahme der Tropfengröße der einen von beiden Lösungen stattfindet. Die Anfertigung geeigneter Capillaren und besonders die Einfüllung der Tropfen erfordert eine gewisse Übung, dann aber bieten sich der Anwendung der scharfen und eleganten Methode keinerlei Schwierigkeiten.

Zum Vergleich wurden in den folgenden, mit der Bargerschen Methode angestellten Versuchen Lösungen von Campher(152)[1]) verwendet, der in den benutzten organischen Lösungsmitteln bei den angewandten Konzentrationen leicht und echt löslich ist. Von Lipoiden wurden geprüft: Kephalin (800)[1]), Lecithin (Ovo-, Merck) (800), „Myelin"[2]) (800), Phrenosin (700) und Cholesterin (386); als Lösungsmittel kamen Chloroform, Petroläther und Äthylalkohol in Anwendung. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Dabei bedeuten die Zahlen die jeweils berechnete molekulare Konzentration, die Zeichen sind zu lesen:

$>$ = „Die Tropfen der linksstehenden Substanz wachsen gegenüber denen der rechtsstehenden (Vergleichs-) Lösung" oder m. a. W.: „Die (auf der linken Seite der Zeile angeführte) Molekularkonzentration der zu prüfenden Substanz erweist sich als höher als die (rechts angeführte) der Vergleichslösung".

$<$ = „Die Tropfen der Löhung der zu prüfenden Substanz nehmen ab" oder m. a. W.: „Die (links angeführte) berechnete Molekularkonzentration der zu prüfenden Substanz erweist sich in Wirklichkeit als niedriger als die (rechts angeführte) der Vergleichslösung".

Tabelle XXI.

1. Lösungsmittel: Chloroform.

Lecithin		Campher
0,097	$<$	0,130
0,097	$<$	0,097
0,097	$<$	0,073
0,097	$<$	0,055
0,097	$<$	0,041
0,097	$<$	0,031
0,097	$>$	0,023

Cholesterin		Campher
0,131	$<$	0,173
0,131	$>$?	0,130
0,131	$>$	0,098
0,131	$>$	0,073

Kephalin		Campher
0,012	$<$	0,015
0,012	$<$	0,010
0,012	$<$	0,007

Phrenosin		Campher
0,010	$<$	0,015
0,010	$<$	0,010
0,010	$<$	0,007

2. Lösungsmittel: Petroläther.

Kephalin		Campher
0,026	$<$	0,184
0,026	$<$	0,016
0,026	?	0,008

Lecithin		Campher
0,039	$<$	0,184
0,039	$<$	0,010
0,039	$>$	0,008

Cholesterin		Campher
0,147	$<$	0,049
0,147	$=$	0,146
0,147	$>$	0,073

[1]) Die in Klammern beigefügten Zahlen geben das für die Berechnung der molekularen Konzentration benutzte (abgerundete) Molekulargewicht der Substanz an.

[2]) Ein durch „Ausfrieren" eines kephalinbefreiten Petrolätherextraktes gewonnenes farbloses, niedrig schmelzendes Phosphatid.

Tabelle XXI (Fortsetzung).

3. Lösungsmittel: Äthylalkohol.

Lecithin		Campher	Cholesterin		Campher	Phrenosin		Campher
0,175	>	0,012	0,030	>	0,012	0,010	<	0,012
0,087	>	0,012	0,015	>	0,012	0,010	=	0,010
0,070	>	0,012	0,011	=	0,012			
0,058	>	0,012	0,008	<	0,012			
0,042 Spur	>	0,012						
0,020	<	0,012						

Wenn auch die Versuche aus äußeren Gründen abgebrochen werden mußten, ehe es möglich war, die Untersuchungen an allen Objekten und mit allen Lösungsmitteln bis zu Ende durchzuführen, so zeigen doch schon die hier aufgeführten Zahlen, daß einmal das Cholesterin in allen organischen Lösungsmitteln ziemlich weitgehend echt gelöst ist, daß andererseits die Dampfdruckerniedrigung der Lösungsmittel durch die übrigen Lipoide stets hinter der nach der Berechnung der gelösten Moleküle zu erwartenden zurückbleibt. Eine Ausnahme bildet das Phrenosin in alkoholischer, nicht jedoch in chloroformiger Lösung; es entspricht dies seiner Eigenschaft, aus Alkohol gut auszukrystallisieren, während es bei der Einengung aus Chloroform nur Kolloidphänomene zeigt. Für das Lecithin zeigt sich, daß die Zahl der in der Dampfdruckerniedrigung sich bemerkbar machenden Moleküle in allen drei Lösungsmitteln ungefähr den vierten Teil der aus dem angenommenen Molekulargewicht berechneten ausmacht; freilich fehlt dem verwendeten Präparat die Sicherheit, daß es sich um reine Substanz handelt; immerhin aber legt dieser Befund den Gedanken an die Möglichkeit nahe, daß bei dem Lecithin — und vielleicht auch bei dem Kephalin — die wahre Molekülgröße die bisher angenommene um das Vierfache übertrifft, und daß dann die P-Komponente nicht von einer einfachen, sondern von einer Tetrametaphosphorsäure geliefert würde, wie denn Parnas[1]) bereits vor einiger Zeit für das Kephalin auf Grund der Ergebnisse der Hydrolyse vermutet hat, daß es mindestens zwei P-haltige Komplexe im Molekül enthalten muß.

Aus dem hier gefundenen Unterschied des Alkohols gegenüber den anderen organischen Lösungsmitteln würden sich viel-

[1]) Laut persönlicher Mitteilung.

leicht die Erfahrungen bei den Gewinnungs- und Reinigungsmethoden der Lipoide erklären, so z. B. bei der Extraktion aus Geweben und bei den Bemühungen um krystallinische Produkte.

4. Das optische Verhalten.

Die opalescente Beschaffenheit der lipoidhaltigen Gewebsextrakte mit organischen Lösungsmitteln, wie auch der Lösungen zahlreicher reiner Lipoide, so besonders des Kephalins und der Cerebroside, ist hinreichend bekannt. Dementsprechend zeigen auch alle diese Lösungen, wie übrigens auch chloroformige Thymollösungen, das Tyndallphänomen.

Die weitgehendste Bestätigung der oben angeführten Beweise der Kolloidnatur der organischen Lipoidlösungen lieferte aber die ultramikroskopische Untersuchung. Es wurden geprüft: Kephalin, Lecithin, Cholesterin, Cerebroside, sowie die durch Extraktion aus Gehirn gewonnenen Lipoidgemische, und zwar in den Lösungsmitteln Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Petroläther, Äther und Benzol. Leider konnte bisher aus äußeren Gründen die Absicht, die Ergebnisse dieser Untersuchungen zugleich in Gestalt photographischer Aufnahmen darzustellen, noch nicht ausgeführt werden. Es wird daher diese Darstellung und die dazu gehörige genauere Ausführung der Untersuchungsergebnisse einer späteren Mitteilung vorbehalten. Hier sei einstweilen nur mitgeteilt, daß alle angeführten Lösungen unter dem Ultramikroskop sich als optisch inhomogen erwiesen; auch die Cholesterinlösungen, besonders die konzentrierteren, wiesen ultramikroskopische Teilchen, wenn auch längst nicht in der Reichhaltigkeit, wie die Lösungen der übrigen geprüften Substanzen auf.

5. Dialysierbarkeit.

Nachdem sich die Kolloidnatur der Lipoide in organischen Dispersionsmitteln erwiesen hat, ist zu erwarten, daß auch die Gewinnungsmethodik dieser Substanzen aus diesem Umstande Nutzen ziehen wird. Es ist wahrscheinlich, daß ihre Trennung aus Lipoidgemischen durch geeignete Dialysier- bzw. Ultrafiltrationsmethoden erleichtert werden wird. Wenn daher auch systematische Versuche nach dieser Richtung noch nicht unternommen worden sind, so erscheint es doch am Platze, hier auf diesen Punkt hinzuweisen.

Da für die Permeabilität einer Membran unter anderem auch ihr Quellungszustand maßgebend ist und die Quellung von Pergament in organischen Lösungsmitteln eine bedeutend geringere ist als in Wasser, so ist es nicht verwunderlich, daß Pergamentmembranen von organischen Lipoidlösungen anstandslos passiert werden. Sogar Tonkerzen sind beispielsweise für chloroformige Kephalinlösungen passierbar. Dagegen scheinen diese die Abtrennung der Cerebroside zu ermöglichen. So zeigte das Tonkerzenfiltrat einer Cerebrosidlösung, die starke Oleocholidreaktion ohne Zuckerzusatz aufwies, negativen Ausfall dieser Reaktion.

6. Zusammenfassung.

Wenn auch die hier angeführten Untersuchungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lipoide nur in Stichproben vorgenommen sind und daher im einzelnen noch wesentliche Lücken aufweisen, so dürften sich doch die folgenden Ergebnisse aus den bisherigen vier Mitteilungen ableiten lassen:

1. Mit Hilfe physikalisch-chemischer Untersuchungsmethoden ergibt sich die Berechtigung, eine Anzahl chemisch differenter organischer Substanzen auf Grund physikalisch-chemischer Gemeinsamkeiten als „Lipoide" zusammenzufassen. Dagegen erweist sich die bisherige Fassung des Lipoidbegriffs als unzutreffend. Die hierhergehörigen Substanzen sind nicht charakterisiert durch ihre Fähigkeit, organische Lösungsmittel darzustellen bzw. in solchen echt löslich zu sein; vielmehr ist die ihnen gemeinsame Eigenschaft die Neigung zu ausschließlich kolloid-disperser Löslichkeit. Unterscheidet man mit Freundlich[1]) lyo-

[1]) Es ist hier nicht der Ort, auf die nicht immer ganz einheitliche Abgrenzung zwischen den beiden Gruppen der Kolloide [lyophile — lyophobe (Freundlich); Suspensions — Emulsions- (Wo. Ostwald); reversible — irreversible (Zsigmondy)] einzugehen; es wird daher mit Freundlich die Tatsache zugrunde gelegt, daß praktisch jedenfalls der Unterschied zwischen beiden in den hier erwähnten Punkten, d. h. in dem verschiedenen Grade der Beziehung zum Dispersionsmittel zu liegen scheint. Auf den Zusammenhang unserer Untersuchungen mit diesen und ähnlichen physiko-chemischen Fragen wird demnächst a. a. O. (Zeitschr. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide, 1912) näher eingegangen werden.

phile und lyophobe Kolloide, so gehören die Lipoide nach der oben erwiesenen Intensität ihrer Beziehungen zum Dispersionsmittel zu den lyophilen; und zwar unterscheiden sich die Lipoide von den, vorzüglich in wässerigem Lösungsmittel kolloid-dispersiblen, „hydrophilen", Kolloiden, deren biologisch wichtigste Repräsentanten die eiweißartigen Substanzen bilden, dadurch, daß sie sowohl in wässerigem, wie in organischem Lösungsmittel kolloide Dispergierbarkeit besitzen. Sie sind also „amphophil".

2. Von den in diesem Sinne als „Lipoide" zu bezeichnenden Substanzen, also den Phosphatiden und Cerebrosiden, ist das bisher mit ihnen zusammengefaßte Cholesterin abzutrennen; wenn sich auch über seine genaueren Eigenschaften noch nichts Endgültiges ermitteln ließ, und wenn es auch praktisch jedenfalls als in organischem Lösungsmittel echt gelöst zu betrachten ist, so weisen doch einige seiner Eigenschaften auf seine Zugehörigkeit zu einer zweiten Gruppe von Substanzen hin, die sich nach den obigen Untersuchungen abgrenzen ließ, und deren Typus am reinsten von dem Thymol repräsentiert wird. Die Substanzen dieser Gruppe treten zwar auch zuweilen mehr oder weniger vollständig kolloiddispers als amphophile Kolloide auf, aber es zeigt sich ihr Dispersitätsgrad abhängig von der Konzentration im Lösungsmittel, so wie dies bisher von den wässerigen Seifenlösungen beschrieben wurde. Auf Grund von Eigenschaften, die sich noch reiner beim Thymol zeigen, sind diese — hydrophilen — Seifenlösungen als Semikolloide bezeichnet worden; es dürfte sich also folgerichtig für die hier beschriebenen amphophilen Semikolloide die Bezeichnung „Semilipoide" empfehlen.

3. Die Hypothese von der Lösefunktion der Lipoide und damit die hieraus abgeleitete Theorie der Stoffaufnahme in die Zelle und der Narkose hat sich aus den studierten Beispielen nicht bestätigt. Das Studium der Abhängigkeit der „Aufnahme" der bei diesen Theorien in Frage kommenden Substanzen durch die Li-

poide zeigt, daß der Prozeß nicht dem Henry-Nernstschen Absorptionsgesetze folgt, sondern eine Adsorption darstellt.

Die Aufnahme von basischen Farbstoffen, organischen Lösungsmitteln und in Wasser gelösten organischen Substanzen durch Lipoide ist keine lineare Funktion der Konzentration, sondern wird durch eine Adsorptionsisotherme bestimmt. Dementsprechend ist von den lipoiden Komponenten der Zellmembran, soweit sie nicht nach dem Zellinnern zu frei beweglich sind, keine Erleichterung, sondern vielmehr eine Hysterese der Aufnahme ins Innere zu erwarten.

Studien in der Chlorophyllgruppe. XVI.

Von

L. Marchlewski.

Über Anhydro-β-Phyllotaonin.

Von

H. Malarski und **L. Marchlewski.**

(Vorgelegt der Akademie der Wissenschaften in Krakau.)

(Eingegangen am 16. Mai 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Bekanntlich unterscheiden sich die Salzsäureumwandlungsprodukte des Chlorophylls und Alkachlorophylls sehr wesentlich. Letzteres gibt in alkoholischer Lösung unter dem Einfluß von Chlorwasserstoff einen Ester des von Schunck entdeckten Phyllotaonins. Dieser Ester, wie auch sein Verseifungsprodukt wurde von Schunck, Joseland und Marchlewski[1]) analytisch untersucht, wobei Werte erhalten wurden, die zur Aufstellung der folgenden Formeln dienten:

$$C_{40}H_{40}N_6O_5, \quad C_{40}H_{39}N_6O_5(C_2H_5), \quad C_{40}H_{39}N_6O_5(CH_3).$$

Die Reinigung dieser Körper war mit großen Schwierigkeiten verknüpft, stufenweise Krystallisationen hatten als Folge ein stufenweises Anwachsen des Stickstoffwertes. Während das zur Krystallisation bestimmte Methylphyllotaonin die Zusammensetzung 70,27% C, 5,89%, 9,89% N erwies, stieg der Stickstoffgehalt nach mehreren Krystallisationen auf 11,87%. Es ist kein Grund vorhanden, die Richtigkeit der damaligen Analysen zu bezweifeln, da übereinstimmende Resultate unabhängig und zu verschiedenen Zeiten von zwei verschiedenen Experimentatoren erhalten wurden.

[1]) Liebigs Annalen 278, 342.

Im Jahre 1907 nahmen Koźniewski und Marchlewski[1]) das Problem des Phyllotaonins von neuem in Angriff. Sie bestätigten zunächst die Ansicht von Marchlewski[2]), daß das sog. sechsbandige Spektrum des Phyllotaonins, wie es in der älteren Chlorophyll-Literatur beschrieben wurde, sich nicht auf eine einheitliche Substanz bezieht, sondern auf ein Gemisch zweier Körper, von denen der eine als lactamartiges Anhydrid des anderen aufzufassen war. Es gelang, dieses Gemisch in seine Komponenten zu zergliedern, und zwar durch Extraktion der ätherischen Lösung mit 4%iger Salzsäure, die nur das Hydrat aufnimmt. Das Lactam verblieb im Äther und konnte diesem erst durch eine Säure, die konzentrierter war als 15% HCl, entzogen werden. Die vollständige Umwandlung des Hydrats in das Lactam gelingt durch Erwärmen, besonders durch häufiges Abdampfen mit Chloroform, während die umgekehrte Umwandlung durch Alkaliwirkung erzielt wird. Das Lactam erhielt damals den Namen Allophyllotaonin. Wir sehen uns veranlaßt, in der Nomenklatur eine Änderung einzuführen. Das Prefix Allo werden wir in Zukunft allein für die Abkömmlinge des Allochlorophylls reservieren, und da das Phyllotaonin, soweit wir bis jetzt ermitteln konnten, aus diesem Chlorophyll nicht gewonnen werden kann, so ist eine Änderung des Namens angezeigt. Andererseits hat das Lactam, nach der Methode von Koźniewski und Marchlewski dargestellt, eine andere Zusammensetzung als das früher untersuchte Phyllotaonin, und ehe das gegenseitige Verhältnis der nach beiden Methoden dargestellten Körper festgestellt wird, halten wir es für zweckmäßig, sie auseinander zu halten. Das nach der neuen Methode dargestellte Produkt nennen wir Anhydro-β-Phyllotaonin und das zugehörige Hydrat β-Phyllotaonin.

Darstellung des Anhydro-β-Phyllotaonins aus Alkachlorophyll.

a) Brennesselblätterpulver (5 kg) wurden mit 15 l siedendem Alkohol übergossen und nach halbstündigem Rühren bei 300 Atmosphären abgepreßt. Die gewonnene Lösung wurde im verzinnten Kupferkessel und Dampfspirale aufgekocht und auf weitere 4 kg Brennnesselblätterpulver gegossen. Nach halbstündigem Rühren

[1]) Liebigs Annalen **355**, 216, 1907.

[2]) Artikel „Blattgrün". Organische Chemie von Brühl, Roscoe, Schorlemmer.

wurde wiederum gepreßt und die gewonnene Lösung filtriert. Das Filtrat wurde mit so viel Kaliumhydrat versetzt, daß die Lösung 2% KOH enthielt. Bald nach dem Zusatz des Kaliumhydrats bildete sich ein brauner, schleimiger Absatz. Nach zweitägigem Stehen der Lösung wurde von letzterem abdekandiert und mit einem Gemisch gleicher Teile Calcium- und Bariumchlorid gefällt. Das Gemisch der gebildeten Barium- und Calciumsalze wurde abfiltriert, mit Alkohol gewaschen und nach dem Trocknen mit konz. Salzsäure behandelt. Auf je 10 g des Salzes kamen 100 ccm Salzsäure zur Anwendung. Die Salzsäurelösung wurde nach dreitägigem Stehen in viel Wasser gegossen und hierauf mit Natriumcarbonat neutralisiert. Die gebildete flockige Abscheidung wurde auf einem Filter gesammelt und nach dem Trocknen mit Chloroform behandelt. Ein Teil blieb ungelöst; er löste sich in Alkohol mit brauner Farbe, und diese Lösung zeigt im Spektrum zwei schmale Bänder im Rot. Dieser Teil wurde vernachlässigt. Die Chloroformlösung zeigte ein Spektrum, das in den Hauptzügen mit denen des Anhydro-β-Phyllotaonins übereinstimmte. Sie wurde eingedampft und mit 100 ccm 10% KOH in Wasser übergossen und langsam bis auf 100° erwärmt. Sodann wurde mit Wasser verdünnt, mit Essigsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Der Äther nahm jetzt das aus dem Anhydro-β-Phyllotaonin durch Sprengung des Lactamringes gebildete β-Phyllotaonin auf, und letzteres konnte durch 4%ige Säure dem Äther entzogen und auf diese Weise weiter gereinigt werden. Nach dem Waschen der 4%igen Säure mit geringen Äthermengen wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, das β-Phyllotaonin durch Äther entzogen und eingedampft. Der Abdampfrückstand wurde sodann einigemal mit Chloroform eingedampft, um eine quantitative Umwandlung in das Lactam zu erzielen. Das so gewonnene Anhydro-β-Phyllotaonin erwies sich aber, dem spektroskopischen Verhalten nach zu urteilen, noch nicht ganz rein, das schwächste im Blau auftretende Band war viel zu schwach, während das vierte zu dunkel erschien. Es zeigte sich, daß die Behandlung mit 10%iger Natronlauge unter Umständen zu einer Veränderung des β-Phyllotaonins Anlaß geben kann, indem Produkte gebildet werden, die die normale Lactamverbindung nicht bilden können.

b) 6 l eines Brennesselblätter-Doppelextrakts wurden wie vorher mit so viel KOH versetzt, daß eine 2%ige Lösung gebildet wurde. Der nach einiger Zeit abgeschiedene braune Niederschlag wurde durch Dekantation abgeschieden und die Lösung mit Bariumchlorid versetzt. Das gebildete Bariumsalz wurde abfiltriert und getrocknet. Sodann wurde es zwecks Entfernung von anhaftenden gelben Farbstoffen der Lypochromgruppe einigemal mit Äther extrahiert. Die Ausbeute an Bariumsalz betrug 70 g. Dasselbe wurde wie folgt weiter untersucht:

1. 10 g des Bariumsalzes wurden mit 100 ccm konz. Salzsäure übergossen, wobei alles in Lösung ging. Nach vierstündigem Stehen wurde in Wasser gegossen und sofort mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung zeigte das reine β-Phyllotaonin-Spektrum. Nach einigem Stehen bemerkt man im Spektrum Veränderungen, die auf die Bildung des Anhydro-β-Phyllotaonins hinweisen, und endlich entsteht eine Lösung, die nahezu das reine Spektrum des letztgenannten Körpers zeigt, mit der Ausnahme jedoch, daß das am stärksten gebrochene Band im sichtbaren Teile des Spektrums nicht erscheint. Wird diese Lösung jetzt mit 15%iger Salzsäure geschüttelt, so bleibt im Äther ein Farbstoff, der das reine Anhydro-β-Phyllotaonin-Spektrum aufweist. Die ätherische Lösung wurde eingedampft, mit alkoholischem Kaliumhydrat übergossen und während 24 Stunden sich selbst überlassen. Sodann wurde Wasser zugesetzt, angesäuert und mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung gab an 4%ige HCl-Säure wider Erwarten nur wenig Farbstoff ab.

2. Jetzt wurde der Einfluß von siedender alkoholischer KOH-Lösung, aber bei kürzerer Dauer, untersucht. Auch hier wurden 10 g des Bariumsalzes verarbeitet, und die Menge des schließlich von 4%iger Salzsäure aufgenommenen Farbstoffs war sehr gering.

Es folgt demnach, daß sowohl wässerige 10%ige KOH-Lösung wie auch alkoholische bei längerer Einwirkung in der Kälte wie bei kürzerer Dauer in der Wärme die Bildung des β-Phyllotaonins nachteilig beeinflußt.

3. Der Rest des Bariumsalzes wurde daher wie folgt verarbeitet. 50 g wurden mit 500 ccm konz. Salzsäure übergossen und 3 Tage lang stehen gelassen. Sodann wurde durch ein Asbestfilter filtriert und in 5 l Wasser gegossen. Der gebildete

Niederschlag wurde gesammelt, mit Wasser säurefrei gewaschen und getrocknet. Nun wurde in Chloroform gelöst, indem 2 Stunden lang unter Rückfluß mit dem Lösungsmittel gekocht wurde, und in 3 l Äther gegossen. Ein Teil war ungelöst geblieben und konnte vernachlässigt werden, da seine alkoholische Lösung ein Spektrum zeigte, das nur aus 2 Bändern im Rot bestand.

Die ätherisch-chloroformische Lösung zeigte ein nicht ganz normales Anhydro-β-Phyllotaonin-Spektrum; das 6. Band im Blau fehlt. Sie wurde mit kleinen Mengen 15%iger Salzsäure wiederholt durchgeschüttelt, wobei das Spektrum infolge der Entfernung von Beimengungen normal wurde. Die ätherische Lösung wurde eingedampft. Der Rückstand wurde mit siedendem Alkohol behandelt, von einem geringen Rückstand abfiltriert und die Lösung so weit konzentriert, daß auf den Wänden des Gefäßes die Abscheidung des festen Farbstoffes bemerkbar wurde. Nun wurde die Lösung stehen gelassen, wobei ein großer Teil des Lactams plötzlich abgeschieden wird. Die mikroskopische Beobachtung läßt keine deutliche krystallinische Struktur erkennen, man beobachtet sternartig gruppierte Gebilde, denen eigentliche krystallinische Struktur nicht beigeschrieben werden kann. Die Abscheidung wurde auf einem gehärteten Filter gesammelt, mit kaltem Alkohol gewaschen und getrocknet. Man erhält so eine stark metallglänzende, pflaumenblaue Masse. Bei 105° getrocknet, erreichte das Präparat sehr bald konstantes Gewicht und gab bei der Analyse folgende Werte:

1. 0,1218 g gaben 0,0645 g H_2O und 0,3111 g CO_2, entsprechend 69,66% C und 5,92% H;

2. 0,1015 g gaben 0,0593 g H_2O uud 0,2591 g CO_2, entsprechend 69,62% C und 5,99% H;

3. 0,1038 g gaben 8,75 ccm N, $t = 15°$, $b = 738$ mm, entsprechend 9,32% N.

c) Um sich über die Ausbeuten ein Urteil bilden zu können, geben wir die Beschreibung des folgenden Versuchs.

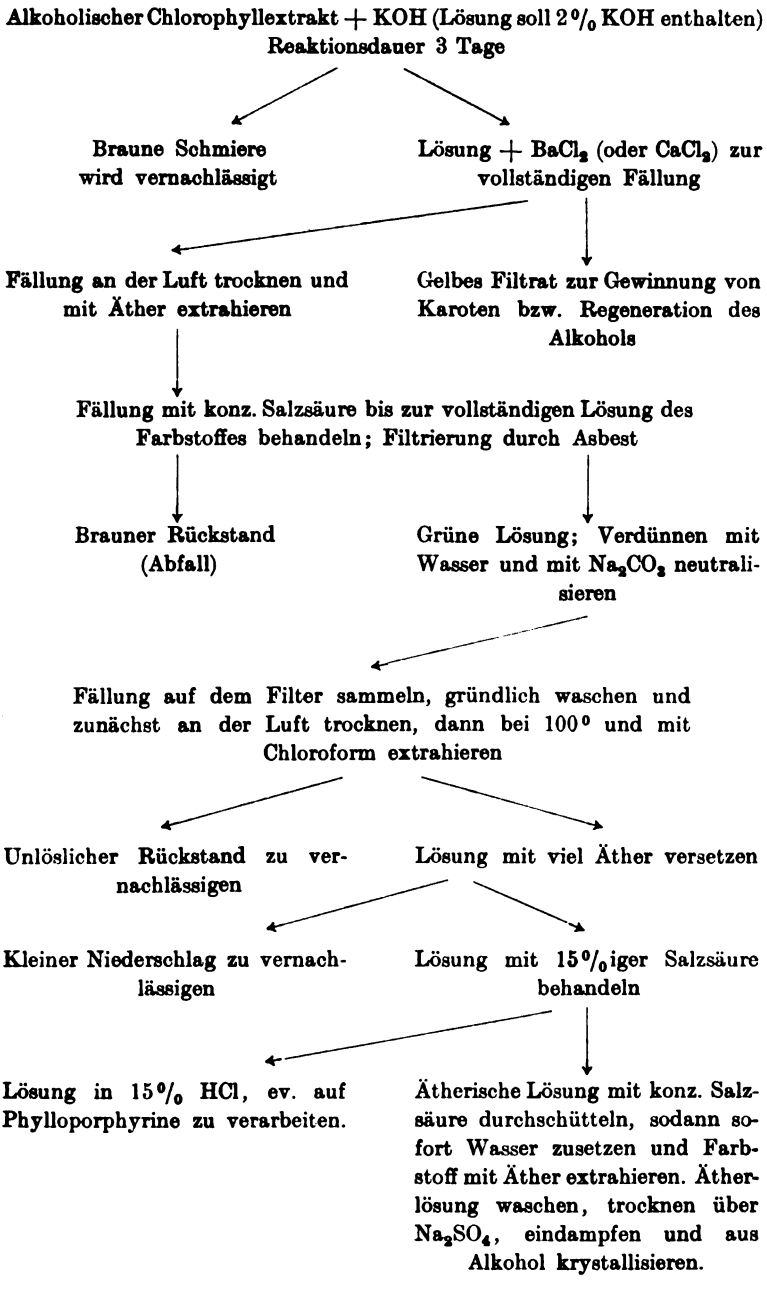
5 kg gepulverte Brennesselblätter wurden mit 15 l siedenden Alkohols versetzt und nach halbstündigem Rühren bei 300 Atmosphären abgepreßt. Erhalten 12 l Extrakt. Diese Lösung wurde nach dem Aufkochen auf 4,250 kg Blätterpulver gegossen und ausgepreßt. Gewonnen 9,2 l des Doppelextraktes.

Zu diesem wurden 150 g KOH zugesetzt und die Lösung 2 Tage lang stehen gelassen. Nun wurde von dem braunen Bodensatze abdekantiert und die Lösung mit $CaCl_2$ vollständig gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, getrocknet und mit Äther zwecks Entfernung gelber Farbstoffe extrahiert. Erhalten wurden 300 g Calciumsalz.

50 g des Salzes wurden mit 500 ccm konzentrierter Salzsäure übergossen. Nach dreitägigem Stehen war nahezu alles gelöst; es wurde das mehrfache Volum von Wasser zugesetzt und filtriert. Der abgeschiedene Farbstoff wurde nach dem Waschen an der Luft getrocknet. Nun folgte Behandlung mit Chloroform, Filtrierung von einer kleinen Menge des Ungelösten und Vermischen mit einer großen Menge von Äther. Von einer kleinen Menge des Abgeschiedenen wurde abfiltriert und die Lösung mit 15% Salzsäure geschüttelt. Letztere nahm Verunreinigungen auf, während im Äther Anhydro-β-Phyllotaonin in optisch reinem Zustande zurückblieb. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels blieben 0,8 g zurück. Die Rechnung ergibt nun, daß 1 kg 0,52 g Anhydro-β-Phyllotaonin liefert.

Die soeben beschriebene Arbeitsart wurde nun noch weiter wie folgt modifiziert. 50 g des Calciumsalzes wurden im Scheidetrichter mit 2 l Äther übergossen und sehr allmählich Essigsäure zugesetzt und tüchtig geschüttelt. Der Farbstoff (Alkachlorophyll) wird in Freiheit gesetzt und vom Äther aufgelöst. Die wässerige Schicht ist braun gefärbt und enthält eine geringe braune Suspension. Die ätherische Lösung wurde mit konz. Salzsäure versetzt, der Farbstoff geht bis auf Spuren eines gelben in die Säure. Die saure Lösung wurde während 6 Tagen stehen gelassen und sodann in Wasser gegossen. Die größte Menge der Säure wurde sodann durch Natriumcarbonatzusatz abgestumpft und der Niederschlag abfiltriert. Nach dem Trocknen wurde mit letzterem so verfahren, wie letzthin beschrieben. Erhalten wurden 0,6 g optisch reinen Anhydro-β-Phyllotaonins. Bemerkt sei, daß die Zeit der Einwirkung der Säure auf das Alkachlorophyll von keinem besonderen Einfluß auf die Ausbeute ist, was besondere Versuche festgestellt haben. Auch braucht die angewandte Säure nicht hoch konzentriert zu sein, bei ihrer Anwendung verläuft die Reaktion aber im allgemeinen glatter. Das folgende Schema gibt einen Überblick über die

von uns jetzt als empfehlenswert angesehene Methode zur Darstellung des Anhydro-β-Phyllotaonins:



Drei verschiedene Präparate, die nach dieser Methode erhalten wurden, ergaben bei der Analyse folgende Resultate:

1. 0,1067 g gaben 8,75 ccm N, $t = 18°$, $b = 743{,}5$ mm, entsprechend 9,21% N;
   0,1000 g gaben 0,0563 g H_2O und 0,2555 g CO_2, entsprechend 69,68% C und 6,30% H.
2. 0,1038 g gaben 8,60 ccm N, $t = 19$, $b = 736$ mm, entsprechend 9,17% N;
   0,1092 g gaben 0,0612 g H_2O und 0,2798 g CO_2, entsprechend 69,88% C und 6,27% H.
3. 0,1159 g gaben 0,0640 g H_2O und 0,2979 g CO_2, entsprechend 70,10% C und 6,18% H.

d) die Bildung des Anhydro-β-Phyllotaonins erfolgt auch aus einem Alkachlorophyll, das durch Einwirkung von Alkalien bei Siedetemperatur des Alkohols erzeugt war. Jedoch ist die Ausbeute an reinem Produkt in diesem Falle geringer. Die Isolierung und Reinigung des Endproduktes geschah bei diesem Produkte genau wie unter c) beschrieben. Bei der Verseifung des doppelten Chlorophyllextraktes wurden auf 6 l 100 g KOH angewandt.

Die Analyse des erhaltenen, aus Alkohol krystallisierten Präparates ergab folgendes:

0,1159 g gaben 0,0635 g H_2O und 0,2935 g CO_2, entsprechend 69,07% C und 6,13% H.

e) Endlich sei noch ein Versuch beschrieben, bei dem das Anhydro-β-Phyllotaonin über das zugehörige Hydrat gereinigt war. Zu diesem Zwecke wurde das Lactam in 100 ccm 0,5%iger Natronlauge gelöst. Nach 5tägigem Stehen, nach welcher Zeit der Farbstoff das Spektrum des β-Phyllotaonins aufweist, wird mit Essigsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. 4%ige Salzsäure entzieht der Lösung das β-Phyllotaonin. Die saure Lösung wird mit Natronlauge nahezu neutralisiert und der Farbstoff durch Äther entzogen. Die ätherische Lösung wird endlich über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das erhaltene Produkt hat krystallinische Struktur (Nadeln und Tafeln) und besteht bereits aus einem Gemisch des Lactams und des Hydrates. Es wird einige Male mit Chloroform eingedampft und endlich über siedendem Toluol getrocknet.

Analyse: 0,1033 g gaben 0,0560 g H_2O und 0,2643 g CO_2, entsprechend 69,78% C und 6,06% N;
0,1044 g gaben 8,2 ccm N, $t = 16°$, $b = 748$ mm, entsprechend 8,97% N.

Darstellung des Anhydro-β-Phyllotaonins aus Chlorophyllan.

Wie wir bereits früher mitteilten, kann Anhydro-β-Phyllotaonin auch aus dem Chlorophyllan gewonnen werden. Nicht jedes Chlorophyllanpräparat ist dazu geeignet und vorläufig sind wir nicht in der Lage anzugeben, welche Bedingungen bei

der Darstellung des Chlorophyllans eingehalten werden müssen, um ein positives Resultat zu erzielen. Die Methode steht übrigens auch in anderen Beziehungen der schon beschriebenen nach, sie liefert aber unter Umständen ein identisches Produkt.

15 g Brennesselchlorophyllan wurden mit 200 ccm 10% KOH in Methylalkohol übergossen und 24 Stunden stehen gelassen. Sodann wurden 2 l Wasser zugesetzt und das Phytol durch Extraktion mit 3 l Äther entfernt.

Die dunkelbraun-olive Lösung wurde mit Essigsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Nahezu der ganze Farbstoff ging in Lösung mit Ausnahme von wenigen Flocken, die abfiltriert wurden. Die ätherische Lösung wurde nach dem Vorgange von Willstätter und Mieg fraktioniert. Von 1%iger Salzsäure wurden 7 l verbraucht, von 3%iger 17 l, von 4%iger 15 l, von 8%iger 12 l, von 10%iger 10 l, von 15%iger 18 l. Die drei schwächeren Säuren waren olivengrün gefärbt, die 8%ig schmutzig rot, während die 10%igen und 15%igen Extrakte rosa erschienen. Die ätherische Lösung, die nach dem Extrahieren mit 15%iger Salzsäure zurückblieb, zeigte ein dem Anhydro-β-Phyllotaonin entsprechendes Spektrum. Sie wurde eingedampft und der Rückstand durch Behandlung mit schwacher Natronlauge in Lösung gebracht. Nach mehrtägigem Stehen wurde mit Essigsäure der Farbstoff in Freiheit gesetzt, mit Äther extrahiert und das gebildete β-Phyllotaonin durch 4%ige Säure entzogen. Sodann wurde nach dem Verdünnen mit Wasser von neuem mit Äther extrahiert, die ätherische Lösung nach dem Waschen mit Wasser eingedampft und der Rückstand endlich einige Male mit Chloroform eingedampft. Das Produkt war optisch rein und zeigte nach dem Trocknen über siedendem Toluol die folgende Zusammensetzung nach den Analysen des Herrn B. Żurkowski:

0,1018 g Substanz gaben 0,0566 g H_2O, 0,2616 g CO_2, entsprechend 70,08% C und 6,22% H;

0,1013 g gaben 0,0563 g H_2O, 0,2595 g CO_2; 69,86% C und 6,22% H.

Zusammensetzung und Formel des Anhydro-β-Phyllotaonins.

Die oben angeführten Analysen mögen hier nochmals zusammengestellt werden:

1.	69,66% C	5,92% H	9,32% N
	69,62 „	5,99 „	
2.	69,68 „	6,30 „	9,21 „
3.	69,88 „	6,27 „	9,17 „
4.	70,10 „	6,18 „	
5.	69,07 „	6,13 „	
6.	69,78 „	6,06 „	8,97 „
7.	69,86 „	6,22 „	
8.	70,08 „	6,22 „	
Im Mittel:	69,75 „	6,17 „	9,17 „

Verschiedene Formeln könnten den obigen Werten entsprechen, unter anderen die folgende $C_{36}H_{36}N_4O_6$, welche verlangt:

C:69,63%, H:5,86%, N:9,03%.

Ausgeschlossen ist es jedoch nicht, daß das Anhydro-β-Phyllotaonin mit einer der Chlorophyllansäuren isomer ist. Willstätter und Utzinger[1]) fanden für das Lactam des Phytochlorins c folgende Werte: 69,86, 70,09, 69,77, 69,69% für C, 6,21, 6,16, 6,06, 6,18% für H und 9,70, 9,76, 9,89, 9,48% für N. Sie stimmen mit den unsrigen, so weit die C- und H-Werte in Betracht gezogen werden, gut überein. Die N-Werte sind etwas höher. Vielleicht liegt das daran, daß wir unsere Analysen nach der Dumasschen Methode, die anderen Autoren nach der Kjeldahlschen ausführten. Falls die Isomerie tatsächlich besteht, dann könnte für das Anhydro-β-Phyllotaonin die Formel $C_{34}H_{34}O_5N_4$ in Betracht gezogen werden, die erfordert 70,55%C, 5,93%H, 9,69%N. Das Studium einiger näherer Abkömmlinge des Anhydro-β-Phyllotaonins, das wir in Angriff genommen haben, wird diese Frage voraussichtlich definitiv aufklären.

Eigenschaften.

Das Anhydro-β-Phyllotaonin stellt eine metallglänzende, stahlblaue, krystallinische Masse dar. Präparate, die an der Luft getrocknet waren, nehmen bei 110° bald Gewichtskonstanz an. Dieselben verlieren dann auch nichts beim Trocknen im Vakuum bei 100°. Das beste Lösungsmittel für die Substanz ist Chloroform, das es auch bei gewöhnlicher Temperatur reichlich löst. Alkohol in der Kälte löst wenig, ziemlich leicht bei

[1]) Liebigs Annalen **382**, 129, 1911.

Siedetemperatur. Die erstere Lösung ist bräunlich-rot, die alkoholische besitzt einen brauneren Ton. Äther und Eisessig lösen ziemlich schwer; im Farbenton stimmt die ätherische Lösung mit der chloroformischen, die essigsaure mit der alkoholischen überein. Das Anhydro-β-Phyllotaonin besitzt nur schwach ausgeprägten basischen Charakter, es wird der ätherischen Lösung erst durch eine Säure, die stärker als 15%ige, entzogen. Dagegen besitzt es stark sauern Charakter. $^n/_{100}$-Natronlauge verursacht beim Schütteln der ätherischen Anhydro-β-Phyllotaoninlösung eine braungrüne Fällung des Natriumsalzes, das durch Essigsäure leicht zersetzt wird unter Regenerierung des ursprünglichen Farbstoffs. Längere Einwirkung konzentrierterer Natronlauge in der Kälte verwandelt das Anhydro-β-Phyllotaonin in das zugehörige Hydrat. Diese Umwandlung kann sehr schön spektroskopisch verfolgt werden. 10% Natriumphosphatlösung mit der ätherischen Lösung des Farbstoffs geschüttelt, verursacht ebenfalls die Bildung des schwer löslichen Salzes. Aus den sauren Eigenschaften des Anhydro-β-Phyllotaonins ist zu schließen, daß diese Verbindung außer einem oder mehreren Lactamringen auch Carboxylgruppen enthält. Sobald der Lactamring durch energischere Alkaliwirkung gesprengt wird, also Aminogruppen frei werden, ändert sich der Charakter der Substanz sehr bedeutend. Das Hydrat ist viel stärker basisch und kann der ätherischen Lösung durch 4% HCl entzogen werden. Die Rückverwandlung des Hydrates in das Lactam erfolgt sehr leicht beim Erwärmen, und es gelang daher bis jetzt das Hydrat nur in der Weise in unveränderter Form zu erhalten, daß seine ätherische Lösung bei gewöhnlicher Temperatur freiwillig verdampfte.

Das hier beschriebene Lactam ist von dem von Willstätter und Utzinger beschriebenen vollständig verschieden. Nach der Beschreibung dieser Autoren (S. 168 l. c.) zu schließen, löst sich dasselbe in 4% HCl, während das unsrige auch von einer 15%igen nur spurenweise aufgenommen wird.

Unter den Umwandlungen, denen das Anhydro-β-Phyllotaonin beim Eingriff energischer Agenzien unterliegt, ist diejenige in α-Phylloporphyrin am wichtigsten. Sie geschieht bei 200° unter dem Einfluß von 10%iger alkohol. KOH-Lösung. Außer schwächer basischen Produkten wird kein anderes (kein

Spektrum des Anhydro-β-Phyllotaonins.

Schichtendicke	2 mm	4 mm	6 mm	8 mm	10 mm
Band I	701,5—682,0	708,0—673,0	709,0—679,0	709,5—678,0 Schatten bis 664,5	713,5—676,0 Schatten bis 660,5
„ II	—	—	—	639,0—628,0	641,5—628,0
„ III	—	—	—	—	—
„ IV	543,5—536,0	544,0—534,5	545,3—534,3	545,5—533,0	546,5—531,5
„ V	—	509,0—499,0	510,0—497,5	510,5—496,0	511,5—495,0
„ VI	—	—	—	484,0—473,5	484,5—473,5

Spektrum des Anhydro-β-Phyllotaonins.

Schichtendicke	2 mm	4 mm	6 mm
Band I	714,0—687,5	720,5—684,0	721,0—677,5
„ II	—	653,0—635,5	657,0—632,0
„ III	—	—	—
„ IV	551,5—542,0	553,0—540,0	555,5—539,0
„ V	—	514,5—501,5	515,5—500,0
„ VI	—	487,0—475,5	489,5—574,0

β-Phylloporphyrin) gebildet. Das Willstättersche Produkt soll unter analogen Bedingungen sein „Phylloporphyrin“ geben, das aber wie früher gezeigt wurde[1]), keine einheitliche Substanz darstellt, sondern ein Gemisch von den Phylloporphyrinen α und β ist.

Unter Berücksichtigung der Resultate, die der eine von uns mit Robel[2]) beim Studium des α-Phyllohämins erhielt, wonach von den noch diskutablen Phylloporphyrinformeln diejenigen mit C_{33} und C_{34} auszuschließen sind und nur die Formeln $C_{31}H_{31}N_4O_2$ und $C_{32}H_{36}N_4O_2$, besonders aber die letztere, zuerst von Schunck und Marchlewski vorgeschlagene, übrig bleiben, würde sich der Vorgang der Anhydro-β-Phyllotaonin-Umwandlung in α-Phylloporphyrin wie folgt formulieren lassen:

$$C_{34}H_{34}O_5N_4 + H_2O = C_{32}H_{36}N_4O_2 + 2\,CO_2.$$

Es erscheint jedoch fraglich, ob außer der Abspaltung von Kohlensäure keine weiteren Verschiebungen im Molekül der Muttersubstanz stattfinden. Die spektralen Eigenschaften beider Substanzen unterscheiden sich so radikal, daß die Annahme einer bloßen Kohlensäureabspaltung nicht wahrscheinlich erscheint.

[1]) Liebigs Annalen **388**, 63, 1912; diese Zeitschr. **39**, 6, 1912.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 816, 1912.

Lösungsmittel Äther. E (für $\lambda = 546$) = 1,9246.

12 mm	14 mm	18 mm	26 mm	40 mm	50 mm
714,0—675,0 Schatten bis 660,0	714,0—658,5	714,0—656,5	720,0—655,5	720,5—624,0	Absorption bis 612,0
642,0—626,5	644,5—626,5	644,8—626,0	646,0—626,0		
—	—	—	—	587,5—577,5	591,0—573,5
546,5—530,5	547,0—529,5	548,5—529,0	550,0—529,0	553,0—527,0	559,5——— (Endabsorpt.)
512,0—495,0	512,0—494,0	513,0—493,5	514,0—493,5	515,5—492,0	—
484,5—471,0	485,5—470,0	486,0—470,0	487,0—467,5	488——— (Endabsorpt.)	—

0,1 g im Liter. Lösungsmittel Chloroform $E_{\lambda = 546} = 2{,}1675$.

10 mm	20 mm	30 mm	50 mm
723,5—676,5	729,5—671,5	733,0—603,0	738,0—599,0
657,5—631,5	659,0—631,0		
—	—	597,0—581,5	601,5—581,0
556,0—535,8	558,0—533,5	560,5—531,0	564,0—528,0
516,5—499,5	518,0—497,5	519,5—497,0	520,0—494,5
490,0—472,5	490,5—471,0	490,2—470,0	491,0—467,0

Unter dem Einfluß von alkoholischer Salzsäure in der Wärme wird Anhydro-β-Phyllotaonin in rote Substanzen umgewandelt, die ganz verschieden von den Porphyrinen sind. Sie sollen Gegenstand einer besonderen Mitteilung werden.

Die spektralen Eigenschaften des Anhydro-β-Phyllotaonins sind höchst interessant. Das Spektrum ist total verschieden von dem des zugehörigen Hydrates. Diesbezüglich können wir uns auf frühere Angaben von Koźniewski und Marchlewski beziehen. Der Vollständigkeit wegen geben wir Zeichnungen, die das Hydratspektrum sowie dasjenige des Lactams und von Gemischen beider zeigen, die man sehr häufig beobachtet, z. B. nach kürzerem Erwärmen des Hydrates, oder beim Versuch, letzteres in krystallinischer Form zu erhalten.

Außerdem geben wir Messungen der Absorptionsbänder, die durch ätherische und chloroformische Lösungen verursacht werden. Da die Substanz in Äther sehr schwer löslich ist, haben wir eine Lösung von unbekannter Konzentration untersucht, deren Extinktionskoeffizient aber genau ermittelt wurde. Die Chloroformlösung enthielt 0,1 g pro Liter.

Wie ersichtlich, sind die spektralen Eigenschaften der ätherischen und chloroformischen Lösungen sich sehr ähnlich.

Nur sind die Bänder der letzteren etwas mehr nach Rot hin verschoben, was zu erwarten war. Das erste Band der ätherischen Lösung ist von einem deutlichen Schatten an der stärker gebrochenen Seite begleitet, der in der chloroformischen weniger deutlich erscheint. Im übrigen ist das Feld zwischen den ersten zwei Bändern in beiden Fällen ziemlich bedeutend verdunkelt,

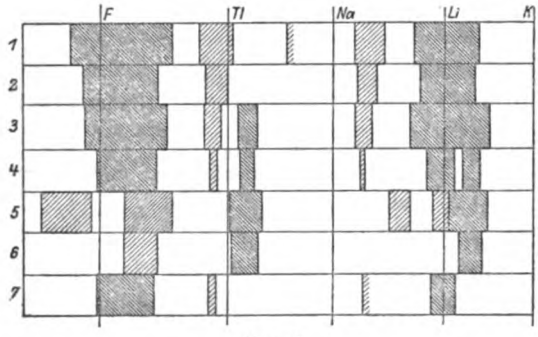


Fig. 1.

1 Spektrum des β-Phyllotaonins.
2 Dasselbe, stärker verdünnte Lösung.
3 Das Spektrum des krystall. sog. Phyllotaonins von Schunck.
4 Dasselbe mehr verdünnte Lösung.
5 Verdünnte Anhydro-β-Phyllotaoninlösung.
6 Dasselbe mehr verdünnt.
7 Sehr verdünnte β-Phyllotaoninlösung.

so daß hier Messungen auf nur geringere Genauigkeit Anspruch machen können. Die erhaltenen Werte für die verschiedenen Wellenlängen, die den Bändern entsprechen, stimmen übrigens hinreichend genau mit denjenigen, die wir früher erhalten haben[1]) und die der eine von uns mit Koźniewski[2]) angegeben hatte.

Die eisessigsaure Lösung des Anhydro-β-Phyllotaonins reagiert sehr leicht mit Zinkacetat. Es wird eine komplexe Verbindung gebildet, die, wie zu erwarten war, sich als identisch erwies mit einer Verbindung, die wir früher unter dem Namen α-Zinco-pro-Phyllotaonin beschrieben haben[3]). Ihre ätherische Lösung gibt an $10\,\%$ige Natriumphosphatlösung nichts ab, $10\,\%$ Na_2CO_3 löst im ersten Augenblick den Farbstoff heraus; das gebildete Natriumsalz fällt aber demnächst in krystallinischen Flocken aus. $10\,\%$ige Natronlauge löst den Farbstoff

[1]) Diese Zeitschr. **28**, 51, 1910.
[2]) Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie **1907**, 623.
[3]) Diese Zeitschr. **21**, 542, 1909.

vollkommen, und wird die Lösung erwärmt, so bildet sich das Natriumsalz des Zink-β-Phyllotaonins (Hydrates), d. h. das komplex gebundene Zink verhindert die Aufspaltung des Lactamringes nicht. Innerhalb der ätherischen Lösung des in Freiheit gesetzten Zink-β-Phyllotaonins (Hydrates) findet nach und nach die Lactambildung statt, die sich gut spektroskopisch verfolgen läßt. Diese Verhältnisse haben wir bereits früher beschrieben und müssen auf das Gesagte verweisen[1]).

Als Beleg der Identität des aus dem Anhydro-β-Phyllotaonin erhaltenen Zinkverbindung mit dem früher beschriebenen α-Zinco-pro-Phyllotaonin mögen die folgenden Messungen dienen.

Anhang.

Seine letzte Mitteilung über den Blutfarbstoff schließt Piloty[2]) mit einem Satz, der einer Korrektur unsererseits bedarf. Es heißt dort: „— . . . Willstätter und Utzinger im weiteren Verlauf ihrer Mitteilung einen wesentlichen Teil unserer Erklärungsversuche, nämlich die Annahme von Lactamringen zur Aufklärung gewisser Erscheinungen am Chlorophyll selbst übernahmen und damit unsere Erklärungsversuche durch die Tat als brauchbar anerkannten." Piloty ist also der Meinung, daß in diesem Falle die Chlorophyllchemie eine Anschauung von der Blutfarbstoffchemie geliehen hat. Dies ist keineswegs der Fall, die Chlorophyllchemie war bereits im Jahre 1907 dazu geleitet worden, Lactamgruppierungen zur Erklärung gewisser Erscheinungen heranzuziehen. Piloty ist diese

Ätherische Lösung $E_{\lambda=546} = 1{,}2168$.

Schichtendicke	2 mm	4 mm	6 mm	8 mm	Früher gefundene Werte[3])	
Band I	687,0—659,0	689,0—655,5	694,5—651,5	695,5—648,5	686,0—657,0	691,0—653,0 } 691,5—610,0
„ II	629,0—614,0	630,5—611,0	633,5—610,5	636,0—607,5[4])	639,5—617,5	640,0—614,5 }
„ III	564,0—554,0	565,0—553,5	565,2—553,0	568,0—552,0	567,0—554,0	567,0—554,0 567,5—551,0
„ IV	—	522,5—512,5	522,5—511,0	523,5—510,8	Spuren	525,5—510,0 525,5—510,5
„ V	—	—	493,5—479,0	494,0—477,0	„	Spuren 494,5—478,5

[1]) Diese Zeitschr. 21, 523, 1910. Photographische Aufnahmen der Spektren finden sich im Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie 1909, Tafel XXV.

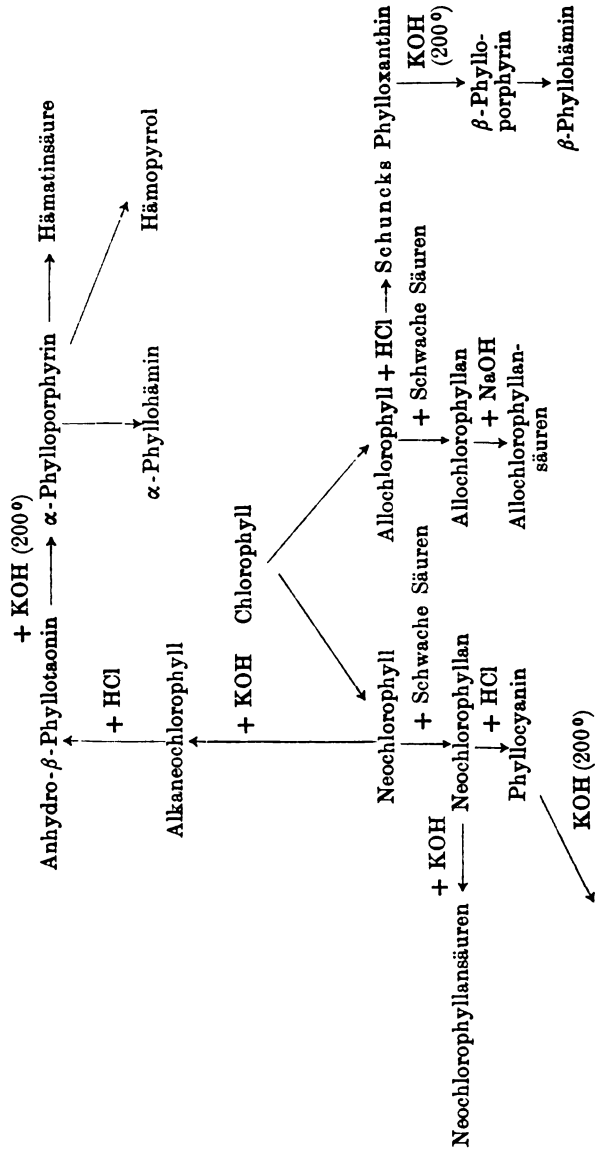
[2]) Liebigs Annalen 388, 329, 1912.

[3]) l. c.

[4]) Feld zwischen I und II stark verdunkelt.

Tatsache wohl dadurch entgangen, daß Willstätter und Utzinger die diesbezügliche frühere Arbeit nicht erwähnten.

Um eine Übersicht zu erleichtern, wollen wir zum Schluß ein Schema der wichtigsten bis jetzt im hiesigen Laboratorium untersuchten Umwandlungen des Chlorophylls, die sich an die von E. Schunck studierten anlehnen, zusammenstellen.



Über komplexe Verbindungen von Ferrosalzen, Wasserstoffsuperoxyd und Eiweißstoffen, ein Beitrag zur Frage nach der Beteiligung des Eisens an biologischen Oxydationen.

Von

F. Röhmann und **T. Shmamine.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 17. Mai 1912.)

In einer auf Anregung und unter Leitung von F. Röhmann ausgeführten Untersuchung hatte W. Spitzer[1]) gezeigt, daß die sauerstoffaktivierende Wirkung gewisser Gewebsextrakte an dem Niederschlage haftet, der in diesen Extrakten durch vorsichtigen Säurezusatz erzeugt wird. Er nahm an, daß die in jenem Niederschlage enthaltenen Nucleoproteide die Sauerstofferreger seien und sprach die Vermutung aus, daß ihre Wirkung durch ihren Eisengehalt bedingt sei.

Von wesentlicher Bedeutung seien aber neben dem Eisengehalt auch die Atomkomplexe, an welche das Eisen gebunden ist.

Der Wunsch, jene Hypothese auf ihre Berechtigung zu prüfen, gab die Veranlassung zu unseren Versuchen.

W. Spitzer dachte, als er seine Hypothese aussprach, offenbar an die bekannten Tatsachen, nach denen Eisensulfat Wasserstoffsuperoxyd „katalysiert" oder die Oxydation des Jodkaliums bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd beschleunigt.

Dies sind Reaktionen, die in einer rein wässerigen Lösung vor sich gehen. In den Nucleoproteiden ist jedoch das Eisen „organisch gebunden". Es befindet sich in Komplexen, in denen es die Ionenreaktionen nicht zeigt. Betrachtet man

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 67, 615, 1897

den Eisengehalt der Nucleoproteide als das für den Oxydationsvorgang Wesentliche, so muß man sich zunächst klar darüber sein, in welcher Weise sich ganz allgemein das in Komplexen befindliche Eisen an dem Zustandekommen von Oxydationen beteiligen kann.

Nach Versuchen von Manchot[1]) oxydiert sich das zweiwertige Eisen in Lösungen, die neben dem Ferrosalz entsprechende Mengen von Kaliumoxalat, Seignettesalz oder Trinatriumcitrat enthalten, leichter als in einer rein wässerigen Lösung. Der Gang der Sauerstoffaufnahme deutete im Oxalatversuche darauf hin, daß hier ein höheres Oxyd als Zwischenstufe entsteht, das die schnellere Oxydation des Ferrosalzes vermittelt.

Wenn sich auch in anderen Fällen solche höheren Oxyde in Lösungen von komplexen Ferrosalzen bildeten, so wäre es möglich, daß gewisse andere, gleichzeitig vorhandene, oxydierbare Stoffe, die der molekulare Sauerstoff allein nicht anzugreifen vermag, durch Vermittelung jener Oxyde angreifbar werden. In der Tat bräunt sich Hydrochinon in einer Lösung, die in 10 ccm einer 1,6%igen Kaliumoxalatlösung 2 ccm einer 2,76%igen Ferrosulfatlösung enthält, allmählich von der Oberfläche der Flüssigkeit her. In einer Lösung von Ferrocitrat oder -tartrat ist dies aber nicht der Fall. Auch ein anderes Beispiel für die sauerstoffübertragende Wirkung von Ferrosalzen könnte man anführen: die Oxydation der arsenigen Säure durch Ferrosulfat[2]). Es kommt aber für uns weniger in Betracht, da der Vorgang anscheinend eine Alkalescenz der Lösung verlangt, die bei biologischen Vorgängen ausgeschlossen ist.

Die an sich nicht stark oxydierende Wirkung des dreiwertigen Eisens, kenntlich z. B. an der Bläuung von Guajactinktur, verschwindet nach Zusatz von Seignettesalz oder Trinatriumcitrat. Auch Hydrochinon, das durch Ferrisulfat unter Bildung von Chinhydron oxydiert wird, wird in einer Lösung, die entsprechende Mengen von Seignettesalz oder Natriumcitrat

[1]) W. Manchot und J. Herzog, Untersuchungen über den Reaktionsmechanismus bei der Oxydation mit gasförmigem Sauerstoff. Zeitschr. f. physikal. Chem. 27, 397, 1901. — Manchot, Die Oxydation des Eisenoxyduls. Zeitschr. f. anorgan. Chem. 27, 404, 1901.

[2]) W. Manchot, Zeitschr. f. anorgan. Chem. 27, 420, 1901.

enthält[1]), nicht oder viel langsamer oxydiert als in einer rein wässerigen Lösung.

Es scheint hiernach kaum, als ob das Eisen in irgendwelchen Komplexen bei neutraler Reaktion für sich allein imstande ist, den molekularen Sauerstoff kräftig zu aktivieren. Jedenfalls sind bisher keine Tatsachen bekannt, die dies genügend bewiesen und eine solche Wirkung im lebenden Organismus wahrscheinlich machten.

Zu einem sehr wirksamen Sauerstofferreger werden aber Ferrosalze, auch in kolloidalen Lösungen, bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd. Hydrochinon und Pyrogallol werden durch weinsaures Eisenoxydulkalium bzw. Gemische von Eisensulfat, Seignettesalz oder Natriumcitrat auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd unter starker Schwarzbraunfärbung der Lösung schnell oxydiert (s. Tabelle).

Auch Ferrisalze können bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd in kolloidalen Lösungen Oxydationen vermitteln. Ferrisulfat, das nach Zusatz von Natriumcitrat oder Seignettesalz Hydrochinon nicht oder nur schwach bräunt, bewirkt eine starke Bräunung sofort auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd. Andere Beispiele liefern die bekannten Versuche von Fenton, Ruff, C. Neuberg und H. D. Dakin, bei denen Ferrisalze unter Mitwirkung von Wasserstoffsuperoxyd zur Oxydation von Salzen gewisser organischer Säuren und anderer, besonders hydroxylhaltiger Verbindungen, aber auch zur Oxydation von Eiweißstoffen und Aminosäuren benutzt werden, mit denen das dreiwertige Eisen bei Gegenwart von Alkali Komplexe zu bilden vermag[2]). Ferner sei die katalytische Wirkung des Berlinerblaus erwähnt, das nach den Versuchen von J. Wolf und E. de Stoecklin[3]) bei Gegenwart von Wasserstoffsuper-

[1]) Siehe auch W. Madelung, Über die Beziehungen der Hämoglobinderivate und Peroxydasen zu anorganischen Katalysatoren. Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 213, 1911.

[2]) Siehe auch H. W. Fischer und E. Brieger, Das Eisen im Blute. Zeitschr. f. physikal. Chem. 78, 582, 1912.

[3]) J. Wolf et E. de Stoecklin, Contribution à l'étude des enzymes oxydants. Annal. de l'Institut Pasteur 23, 841, 1909. — J. Wolf, Sur quelques peroxydases artificielles, du rôle capital du fer dans leur action. Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 146, 142. 781. 1217. 1415, 1908; 148, 500.

oxyd die Oxydation verhältnismäßig großer Mengen von Hydrochinon und Pyrogallol vermittelt. In diesen Fällen kann man wohl annehmen, daß der Wirkung des dreiwertigen Eisens stets eine Reduktion vorangeht. Beim Berlinerblau sieht man vor dem Eintritt der Oxydation eine Entfärbung der vorher braunen Flüssigkeit (vgl. Tabelle).

1 ccm	10 ccm	2 ccm	2 ccm	Bemerkungen.
Hydrochinon 2,2%	Natriumcitrat 1,15%	—	—	farblos
„	„	—	H_2O_2 ca. 3%	schwach rötlich
„	Wasser	Ferrosulfat 2,76%	—	farblos
„	Natriumcitrat	„	—	farblos
„	Wasser	„	H_2O_2	sofort braunschwarz[1])
„	Natriumcitrat	„	„	sofort braunschwarz[2])
„	Seignettesalz 2,1%	„	—	keine Verfärbung
„	Seignettesalz	„	H_2O_2	sof. schwarzbraun, aber schwächer als ohne Seignettesalz[3])
„	Weinsaures	Eisenoxydul-kalium	„	ähnlich wie vorher
„	Wasser	Berlinerblau ca. 0,04%	—	entfärbt
„	Natriumcitrat	„	—	viel schneller entfärbt
—	„	„	H_2O_2	blau
Hydrochinon	Wasser	„	„	allmählich rötlich bis braun
„	Natriumcitrat	„	„	sehr schnell dunkelbraun
Pyrogallol	Wasser	Ferrosulfat	H_2O_2	sofort schwarzbraun
„	Seignettesalz	„	„	schwarz violett
„	Natriumcitrat	„	„	schwarz violett, dann schwarz
„	Wasser	Berlinerblau	„	zuerst entfärbt, dann braun
„	Seignettesalz	„	„	schneller entfärbt und gebräunt
„	Natriumcitrat	„	„	schnell braun unter Entwicklung von CO_2

Nehmen wir als Komplexbildner Eiweißlösungen, so beobachten wir folgendes.

Ferrisalze erzeugen in den verschiedenen Eiweißlösungen und auch in den Lösungen gewisser Albumosen Niederschläge.

[1]) Vgl. T. Kikkoji und C. Neuberg, diese Zeitschr. 20, 523, 1909.

[2]) Mischt man zuerst Natriumcitrat, $FeSO_4$ und H_2O_2, so erhält man eine gelbe saure Flüssigkeit, in der sich Hydrochinon nur allmählich schwach braun färbt.

[3]) Mischt man Seignettesalz, $FeSO_4$ und H_2O_2, so erhält man eine violette schwachsaure Lösung, die durch Hydrochinon nur langsam verfärbt wird.

Sie sind beim Hühnereiweiß, nucleinsaurem Natrium u. a. mehr oder weniger gallertig und lassen sich nicht ohne hydrolytische Zersetzung auswaschen. Untersucht man sie feucht oder bringt man sie mit Alkoholäther zur Trockne, so bläuen diese Niederschläge Guajactinktur und bewirken in einer Hydrochinonwasserstoffsuperoxydlösung allmählich Braunfärbung. Hier handelt es sich anscheinend nur um die Wirkung von ionalem, durch Hydrolyse aus den Eiweißniederschlägen abgespaltenem oder vom Niederschlag mit niedergerissenem dreiwertigem Eisen.

Der in Albumosen erzeugte Niederschlag (siehe die folgende Mitteilung) hält das Eisen fester und zeigt keine oder fast keine Oxydationswirkung.

Löst man die Niederschläge in verdünntem Alkali vorsichtig, ohne daß die Lösung für Curcumapapier alkalisch wird, so zeigen diese Lösungen unmittelbar keine Oxydationswirkung. Auch bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd wirken sie nicht oder nur schwach oxydierend.

Eine 5%ige Lösung von Hühnereiweiß wird mit einer 3,6%igen Lösung von Ferrisulfat ausgefällt. Der Niederschlag wird zweimal mit Wasser und zweimal mit Alkohol zentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum unter P_2O_5 getrocknet. Er enthielt 13,0% N und 3,1% Fe. — Mit H_2O_2 keine oder sehr geringe Gasentwicklung, mit H_2O_2 und NaOH starke Gasentwicklung, mit Hydrochinon und H_2O_2 allmählich Schwarzfärbung.

3%ige Lösung von Hühnereiweiß, filtriert. 10 ccm geben mit 1 ccm 3,6% iger Ferrisulfatlösung einen Niederschlag, der tropfenweise unter Umrühren mit so viel $^1/_4$ n-NaOH versetzt wird, bis ein kleiner Teil ungelöst bleibt. Die Lösung reagiert für rotes und blaues Lackmuspapier neutral. Diese Lösung zeigt weder als solche, noch nach Zusatz von H_2O_2 eine Wirkung auf Guajactinktur. Hydrochinon wird langsam gebräunt. Mit Natronlauge und Wasserstoffsuperoxyd Gasentwicklung.

Berlinerblau wird in einer Lösung von Hühnereiweiß und Hydrochinon nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd schneller entfärbt als in einer rein wässerigen Lösung; auch ist in ihr die Bräunung stärker als in jener.

3%ige Lösung von Caseinnatrium. 10 ccm mit 1 ccm 3,6%igem Ferrisulfat, Niederschlag in verdünnter Natronlauge gelöst, Kohlensäure eingeleitet. Keine Oxydationswirkung, auch nicht nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd.

Eine 5%ige Lösung von nucleinsaurem Natrium[1]) wird mit einer 3,6%igen Lösung von Ferrisulfat versetzt, bis kein Niederschlag

[1]) Für Überlassung des zu unseren Versuchen nötigen Materials sind wir der Firma Böhringer Söhne in Mannheim zu Dank verpflichtet.

mehr entsteht. Der Niederschlag wird auf der Zentrifuge wiederholt mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther behandelt. Die trüben Waschwasser bläuen bis zuletzt Guajactinktur. Auch das trockene gelbrote Pulver bläut Guajactinktur und bräunt Hydrochinon bei Gegenwart von H_2O_2, wenn auch langsamer als der feuchte Niederschlag. — Wird der durch Ferrisulfat erzeugte Niederschlag vorsichtig in $^1/_4$ n-NaOH gelöst, so bläut die Lösung Guajactinktur gar nicht oder sehr allmählich, bräunt nach Zusatz von H_2O_2 Hydrochinon allmählich und färbt Pyrogallol erst violett, dann allmählich schwarz. Mit Wasserstoffsuperoxyd und Natronlauge stürmische Gasentwicklung.

Auch Ferrosalze beschleunigen in Eiweißlösungen, wie zu erwarten, die Oxydation von Guajac, Hydrochinon und Pyrogallol durch molekularen Sauerstoff nicht wesentlich. Sie induzieren aber auch in Eiweißlösungen unter gewissen Bedingungen die Oxydation dysoxydabler Stoffe durch Wasserstoffsuperoxyd.

Hühnereiweiß läßt sich mit Eisensulfat mischen, ohne daß ein Niederschlag eintritt. Die Lösung zeigt keine Oxydationswirkung auf Guajac, Hydrochinon und Pyrogallol. Löst man aber in 3%igem Hühnereiweiß 2,2% Hydrochinon, filtriert den Niederschlag ab und fügt auf 10 ccm der Mischung 1 ccm 1,38%ige Eisensulfatlösung hinzu, so entsteht auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd ein schwarzer Niederschlag. Mit weinsaurem Eisenoxydulkalium und Wasserstoffsuperoxyd färbt sich die Hydrochinon enthaltende Eiweißlösung braun.

In Lösungen von Caseinnatrium erzeugt Eisensulfat einen Niederschlag. Enthält die Caseinlösung gleichzeitig Hydrochinon, so färbt sich der durch Eisensulfat erzeugte Niederschlag auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd schwarz. Auch wenn man zuerst Caseinnatrium, Hydrochinon und Wasserstoffsuperoxyd mischt und dann Eisensulfat hinzusetzt, erhält man einen schwarzen Niederschlag.

Löst man den durch Ferrosulfat in Caseinnatrium erzeugten Niederschlag in verdünnter Natronlauge auf, so färbt sich die Lösung auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd gelbrot. Hydrochinon wird in ihr nicht geschwärzt.

Nucleinsaures Natrium gibt mit Ferrosulfat einen Niederschlag, der sich im Überschuß des nucleinsauren Natriums löst.

10 ccm einer 5%igen Lösung von nucleinsaurem Natrium gibt mit 2 ccm einer 2,2%igen Hydrochinon- und 2 ccm einer 2,76%igen Ferrosulfatlösung eine klare Flüssigkeit, die sich auf Zusatz von 2 ccm einer etwa 0,6%igen Wasserstoffsuperoxydlösung sofort schwarz färbt. Enthält die Flüssigkeit statt Hydrochinon Pyrogallol, so ist sie violett und färbt sich allmählich braun.

Mischt man in demselben Verhältnis wie vorher nucleinsaures Natrium, Eisensulfat und Wasserstoffsuperoxyd, so bläut dieses Gemisch Guajactinktur und Hydrochinon.

Eine 5%ige Lösung von Pepton Witte färbt sich, wenn auf 10 ccm 2 ccm einer 2,76%igen Ferrosulfat- und 2 ccm einer 0,6%igen Wasserstoffsuperoxydlösung hinzugesetzt werden, braun. Enthält die Lösung Hydrochinon, so färbt sie sich schwarz.

Bei Anstellung der beschriebenen Reaktionen wurde die Beobachtung gemacht, daß in Lösungen von Hühnereiweiß und Albumosen, die sich mit Ferrosalzen mischen lassen, ohne daß ein Niederschlag entsteht, ein solcher auftritt, wenn man die dem Eisen entsprechende Menge Wasserstoffsuperoxyd hinzufügt. In nucleinsaurem Natrium entstand eine gallertige Fällung, die erst nach Zusatz von Alkohol besser filtrierbar wurde. Diese Niederschläge bläuen feucht Guajactinktur und induzieren die Oxydation von Hydrochinon und Pyrogallol. Durch die Behandlung mit Alkohol und Äther büßen sie dieses Vermögen mehr oder weniger ein.

Ähnliche Niederschläge entstehen, wenn man zuerst Eisensulfat und Wasserstoffsuperoxyd in der äquivalenten Menge mischt und diese Mischung zur Eiweißlösung hinzusetzt. Diese durch Ferrosalz und Wasserstoffsuperoxyd in Eiweißlösungen erzeugten Fällungen bestehen anscheinend aus komplexen Verbindungen des betreffenden Eiweißstoffes mit Ferrosulfat-Wasserstoffsuperoxyd und mögen kurz als Oxyferro-Eiweißverbindungen bezeichnet werden.

Oxyferroalbumin. 10 g Hühnereiweiß werden in 200 ccm Wasser gelöst, die Lösung wird mit sehr verdünnter Essigsäure angesäuert und filtriert. Vom Filtrat werden 175 ccm auf 350 ccm verdünnt, mit 70 ccm einer 6,9%igen Ferrosulfat- und 70 ccm einer etwa 1%igen Wasserstoffsuperoxydlösung versetzt. Es entsteht ein Niederschlag, der über Leinwand bei sehr geringem Druck abgenutscht, zweimal in Wasser suspendiert, zentrifugiert und auf Tonteller getrocknet wird. Der feuchte Niederschlag bläut Guajactinktur, aber langsamer als der durch Ferrosulfat und Wasserstoffsuperoxyd in Albumosen (siehe unten) erzeugte Niederschlag. Noch langsamer wirkt der mit Alkohol und Äther getrocknete Niederschlag auf Guajactinktur. Er zersetzt sich auf Zusatz von Natronlauge bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd unter Gasentwicklung.

Der durch Eisensulfat und Wasserstoffsuperoxyd in der Lösung von Hühnereiweiß erzeugte weiße Niederschlag kann in verdünnter Natronlauge gelöst werden, ohne daß die Flüssigkeit alkalische Reaktion für Lackmus annimmt.

Oxyferronucleinsäure. 5 g nucleinsaures Natrium werden in 50 ccm Wasser gelöst und 50 ccm einer 2,76%igen Eisensulfatlösung zugefügt. Die größte Menge von letzterem kann hinzugesetzt werden,

ohne daß sich die Lösung trübt. Erst zuletzt wird die Flüssigkeit stark opalescent. Auf Zusatz von 5 ccm ca. 3%igen Wasserstoffsuperoxyds färbt sich die Lösung dunkel, ohne daß Gasentwicklung eintritt. Nach Zusatz von Alkohol entsteht ein gallertiger Niederschlag, der noch feucht Guajactinktur bläut und sich auf Zusatz von Natronlauge unter stürmischer Gasentwicklung zersetzt. Mischt man eine Lösung von Hydrochinon bzw. Pyrogallol mit Wasserstoffsuperoxyd und trägt etwas von dem Niederschlag ein, so erfolgt schnell die Oxydation beider Stoffe. Beim Behandeln mit Alkohol verliert der Niederschlag den größten Teil seiner oxydierenden Wirkung, indem Alkohol, wie der Geruch zeigt, zu Aldehyd oxydiert wird.

Einer eingehenderen Untersuchung wurde der Niederschlag unterzogen, der durch Ferrosalz und Wasserstoffsuperoxyd in einer Albumosenlösung entsteht.

Oxyferropeptonat. Versuch: 27. XI. 1909. Auf Grund eines Vorversuches werden 460 ccm 5%iger Peptonlösung mit 60 g Ferroammonsulfat, die in 765 ccm Wasser gelöst sind, und 212 ccm 3%igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Nach zweitägigem Stehen wird der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und mit Alkoholäther in Pulverform gebracht. Ausbeute 11 g.

Verlust beim Trocknen 16,5%.

Elementare Zusammensetzung: 36,0% C, 4,7% H, 11,0% N, 11,1% Fe, 12,3% SO_4.

Der Niederschlag löst sich in verdünntem Alkali, ist durch Zusatz von verdünnter Salz- oder Schwefelsäure wieder fällbar und im Überschuß der Säure löslich. In der alkalischen Lösung erzeugt farbloses Schwefelammonium nur eine Schwarzfärbung, keinen Niederschlag; mit Salzsäure und Ferrocyankalium blauer Niederschlag, beim Erwärmen mit Natronlauge rotbrauner Niederschlag.

In den folgenden Versuchen wurde die Peptonlösung vor dem Zusatz von Ferrosalz und Wasserstoffsuperoxyd mit Ferrisalz ausgefällt.

Versuch vom 8. II. 1910. 800 ccm 5%iger Peptonlösung werden mit 195 ccm 10%iger Ferriammonsulfatlösung versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert. Im Filtrat wird durch Zusatz von Ferriammonsulfatlösung und Wasserstoffsuperoxyd ein massiger Niederschlag erhalten. Der Niederschlag wird mit Wasser gewaschen und mit Alkoholäther behandelt. Ausbeute etwa 33 g.

Verlust beim Trocknen 13,75%.

In Trockensubstanz: 38,0% C, 5,5% H, 11,5% N, 9,45% Fe, 13,23% SO_4.

1 g der lufttrockenen Substanz erfordert bis zur beginnenden Braunfärbung von Curcumapapier etwa 11,8 ccm ca. $^1/_4$ n-NaOH (1 ccm = 6,2 mg Na). Die schwache Alkalescenz verschwindet bei längerem Stehen. Auf Zusatz von verdünnter Salzsäure entsteht ein Niederschlag, der sich im Überschuß löst. Auf Zusatz von Schwefelammonium oder beim Durchleiten von Schwefelwasserstoff färbt sich die Lösung schwarz

ohne Abscheidung von Schwefeleisen. Mit Salzsäure und Ferrocyankalium entsteht sofort ein blauer Niederschlag.

Versuch vom 20. III. 1911. 300 ccm 10%iger Peptonlösung werden mit 15 ccm 3,6%iger Ferrisulfatlösung versetzt und filtriert. Man löst 45 g Ferrosulfat in 200 ccm Wasser und setzt allmählich 100 ccm 3%iges Wasserstoffsuperoxyd hinzu. Diese Lösung wird in das Filtrat des durch Ferrisalz erzeugten Niederschlages hineingegossen. Es entsteht sofort ein Niederschlag, der nach wenigen Minuten durch Leinwand abgegossen und mit Alkoholäther behandelt wird. Ausbeute 11 bis 12 g.

Dieser Niederschlag 1 ist dunkelziegelrot.

Verlust beim Trocknen 12,1%.

In Trockensubstanz: 10,0% N, 12,3% Fe, 20,7% SO_4.

0,5100 g der lufttrockenen Substanz wurden mit etwas Wasser angerührt. Nach Zusatz von 21,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH (siehe oben) wurde Curcuma bleibend braun gefärbt. Zum Zurücktitrieren bis Verschwinden der Braunfärbung waren 0,85 ccm $^1/_{10}$ n-HCl erforderlich.

Beim Übergießen mit 10%iger NaOH bildete sich unter deutlicher Gasentwicklung eine braune kolloidale Lösung. Nach kurzer Zeit schied sich Eisenhydroxyd ab.

Beim Übergießen mit H_2O_2 trat nur eine minimale Gasentwicklung ein, auf Zusatz von NaOH explosives Aufschäumen; ebenso wenn man etwas von dem Pulver in eine alkalische Lösung von Wasserstoffsuperoxyd brachte.

Aus dem Filtrat des Niederschlages 1 schied sich beim Stehen bis zum folgenden Tage ein fein pulveriger, ockergelber Niederschlag 2 ab, der sich nur schlecht abfiltrieren ließ. Ausbeute 3,2 g.

Verlust beim Trocknen 9%. Er enthielt 26,6% Fe und 6,3% N. Zu Natronlauge und Wasserstoffsuperoxyd verhielt er sich ähnlich wie Niederschlag 1. Er enthielt also anscheinend neben der Albumosenverbindung noch basisches Eisensalz.

Durch Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd zum Filtrat vom Niederschlag 2 entsteht, ohne daß eine Gasentwicklung zu beobachten ist, ein neuer Niederschlag.

Niederschlag 3, feines graubraunes Pulver. Ausbeute 9,8 g.

Verlust beim Trocknen 7,8%.

In Trockensubstanz: 10,4% N, 11,2% Fe, 16,5% SO_4.

0,507 g bilden, in Wasser suspendiert, nach Zusatz von 19 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH eine für Curcuma alkalische braune Lösung. Auf Zusatz von 1,8 ccm $^1/_{10}$ n-HCl ist die Lösung für Curcuma neutral und wird etwas trübe. Diese Lösung zersetzt H_2O_2 nicht. Auf Zusatz von 10%igem NaOH wird die Lösung klar und zeigt starke Gasentwicklung.

Die Lösung des Ferroniederschlages bläut weder neutral noch bei Überschuß von Säure oder Alkali, noch bei Gegenwart von H_2O_2 Guajactinktur.

Mit $BaCl_2$ entsteht in der Lösung eine starke, in Salzsäure unlösliche Trübung von $BaSO_4$.

Alle drei Niederschläge bläuten Guajactinktur, wenn sie in diese als Pulver eingetragen werden, in kurzer Zeit, ebenso bei Gegenwart von H_2O_2, aber nicht, wenn die Lösung alkalisch ist. Sie bewirken, daß eine wässerige Guajacollösung sich bald rotbraun, bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd bald schwarzbraun färbt; in Hydrochinon- und Pyrogallollösungen bewirken sie ebenfalls schnell schwarzbraune Färbung. Sie beschleunigen in einer Lösung von α-Naphthol, p-Phenylendiaminchlorhydrat und Natriumcarbonat die Blaufärbung.

Versuch vom 27. VI. 1911. 300 ccm 10%iger Peptonlösung wurden mit etwa 20 ccm 3,6%iger Ferrisulfatlösung versetzt und filtriert. Hierauf wurden 45 g Ferrosulfat in 200 ccm Wasser gelöst, abgekühlt und mit 100 ccm gekühltem 3%igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Diese Flüssigkeit färbt sich unter reichlicher Sauerstoffentwicklung schwarzbraun. Sie wird zu dem abgekühlten Filtrat des Ferrisalzniederschlages gesetzt. Es entsteht ein Niederschlag, der, nachdem er 10 Stunden in der Kältemischung gestanden hat, an der Saugpumpe über Leinwand filtriert und durch Behandeln mit Alkohol und Äther zur Trockne gebracht wird. Dieser Niederschlag 1 ist ziegelrot. Ausbeute etwa 11 g. Zu dem Filtrat wird eine weitere Menge Wasserstoffsuperoxyd hinzugefügt und nach $^1/_4$ Stunde filtriert. Dieser Niederschlag 2 bildet nach der Behandlung mit Alkohol und Äther 6,5 bis 7 g eines graubraunen Pulvers. Im Filtrat dieses Niederschlages entsteht bei weiterem Zusatz ein graubrauner Niederschlag 3 von etwas mehr als 3 g. Das schwarzbraune Filtrat dieses Niederschlages bleibt bei weiterem Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd klar, erst beim Stehen bildet sich allmählich ein geringer Niederschlag.

Niederschlag 1. Verlust beim Trocknen 14,6%.

In Trockensubstanz: 35,7% C, 6,6% H, 11,0% N, 12,3% Fe, 19,9% SO_4, auf Eisen- und SO_4-freie Substanz berechnet: 51,6% C, 9,32% H, 15,35% N.

Niederschlag 2 und 3 vereinigt. Verlust beim Trocknen 14,7%.

In Trockensubstanz: 33,2% C, 6,6% H, 9,9% N, 12,0% Fe [16,9% SO_4].

Aus den beschriebenen Versuchen seien zunächst die Zahlen für die elementare Zusammensetzung des Oxyferropeptonats zusammengestellt.

Datum	C	H	N	Fe	SO_4	$\frac{Fe}{SO_4}$
27. XI. 1909	36,03	4,69	11,0	11,1	12,35	0,9
8. II. 1910	38,0	5,5	11,5	9,4	13,23	0,71
20. III. 1911 a)	—	—	10,0	12,3	20,7	0,59
b)	—	—	10,4	11,2	16,5	0,68
27. VI. 1911 a)	35,7	6,6	11,0	12,3	19,9	0,62
b)	33,2	6,6	9,9	12,0	[16,9]	—

Die Zusammensetzung des Niederschlages, der bei den verschiedenen Versuchen in der Albumosenlösung durch Ferrosalz und Wasserstoffsuperoxyd erhalten wurde, schwankt, wie man sieht, innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Zum Teil hängt dies mit der Art, wie die Fällung bewirkt wurde, zum Teil mit der Art und der Dauer des Auswaschens der Niederschläge zusammen.

Eine besondere Beachtung verdient das Verhältnis von Eisen und Schwefel. Die Schwefelbestimmung des Oxyferropeptonates zeigte einen so unerwartet hohen Wert, daß er sich nur dadurch erklären ließ, daß mit dem Eisen auch das SO_4-Radikal in den Niederschlag hineingegangen war. Hiervon kann man sich auch in der Tat leicht unmittelbar überzeugen. Verkohlt man die Substanz vorsichtig unter Zusatz von Natriumcarbonat, so erhält man bei der Extraktion mit Wasser eine Menge Schwefelsäure, die nur wenig hinter der beim Schmelzen mit Natriumsuperoxyd erhaltenen zurücksteht. Das Verhältnis $Fe:SO_4$ ist aber mehr oder weniger höher als im Eisensulfat (0,57), was darauf hindeutet, daß der Niederschlag leicht etwas basisches Eisensalz enthalten kann.

Um zu untersuchen, ob die Albumosen bei der Fällung mit Ferrosalz und Wasserstoffsuperoxyd tiefergreifende Veränderungen erfahren haben, wurden Versuche gemacht, das Eisen und die Schwefelsäure wieder vom Eiweißrest zu trennen. Sie stießen aber auf sehr erhebliche, nicht vollkommen überwundene Schwierigkeiten. Am zweckmäßigsten erwies sich bisher eine vorsichtige Behandlung mit Baryt. Hierbei ging ein Teil der Albumosen, anscheinend ohne wesentliche Veränderungen erlitten zu haben, in Lösung.

Niederschlag 2 und 3 vom 27. VI. 1911. 0,9975 g lufttrockene Substanz wurden mit 20 bis 22 ccm $^1/_5$ Normalbarytlösung verrieben. Die Lösung färbt Curcuma braun. Am folgendem Tage ist die Reaktion auf Lackmus schwach alkalisch. Es wird noch etwas Baryt hinzugesetzt und geschüttelt. Im Filtrat werden 35,85 mg N gefunden. Der mit Baryt behandelte Rückstand wird mit Soda behandelt, hierbei gehen weitere 8,4 mg N in Lösung. Im ganzen sind also 49,2 mg N in Lösung gegangen, d. h. etwa 52,5 % des Gesamt-N.

Niederschlag 1 vom 27. VI. 1911. Zur Zerlegung werden 5 g der Substanz allmählich mit 50 ccm einer 6,4 %igen Barytlösung verrieben.

A. Der Niederschlag wird abgesaugt. Das klare Filtrat reagiert auf Curcuma schwach alkalisch. Beim Einleiten von Kohlensäure bleibt es klar. Es wird etwas eingeengt und sehr vorsichtig mit $^1/_4$ Normalschwefelsäure versetzt, bis die Flüssigkeit rotes Lackmoidpapier nur noch schwach bläut. Das Bariumsulfat wird abfiltriert, das Filtrat eingeengt und mit 2 bis 3 Volumen Alkohol gefällt.

a) Fällung: Farbloses, trockenes Pulver verliert, nachdem es unter P_2O_5 getrocknet ist, beim Trocknen im Trockenschranke noch 3,8% seines Gewichts, enthält auf Trockensubstanz berechnet 50,0% C, 8,1% H.

Millonsche Reaktion schwach, Schwefelreaktion schwach, α-Naphtholreaktion ziemlich schwach bzw. negativ, Glyoxalsäurereaktion stark, mit Essigsäure und Kochsalzfällung, die sich beim Erwärmen löst, beim Erkalten wieder erscheint. Mit Ferrisulfat gibt diese Albumosenlösung keine Fällung, durch Ferrosulfat und Wasserstoffsuperoxyd wird sie gefällt.

b) Das Filtrat enthält noch eine kleine Menge anscheinend der gleichen Albumosen.

B. Aus dem ohne Erwärmen mit Baryt behandelten Niederschlage läßt sich durch Erwärmen mit 20 ccm derselben Barytlösung noch eine weitere Menge Albumosen gewinnen.

Ein Versuch, der an einem anderen Oxyferropeptonat durchgeführt wurde, verlief ähnlich. Das hierbei erhaltene Albumosengemisch gab beim Kochen mit alkalischer Bleilösung noch eine starke Schwefelreaktion.

Das Oxyferropeptonat ist nach diesen Versuchen zu betrachten als ein Gemisch von komplexen Eisenverbindungen. Zusammen mit dem Eisen ist auch der bei weitem größte Teil der Schwefelsäure in Verbindung mit den Albumosen getreten.

Eine weitere Frage ist nun: welche Rolle hat bei der Entstehung des Niederschlages das Wasserstoffsuperoxyd gespielt?

Von H. W. Fischer und E. Brieger[1]) wird angenommen, daß beim Zusammentreffen von Ferrisalzen mit Wasserstoffsuperoxyd in komplexbildenden Lösungen bei entsprechender Alkalescenz „Eisensäure", also ein höheres, säurebildendes Oxyd des Eisens entsteht. Wäre ähnliches auch in unseren Versuchen der Fall, so müßte man annehmen, daß die „Eisensäure" die Fällung bewirkt. Der Niederschlag wäre dann eine salzartige Verbindung, in der der Eiweißkörper die Rolle der Base spielt. Der hohe Gehalt an Schwefelsäure und andere

[1]) a. a. O.

Tatsachen lassen uns für die Erklärung der Oxyferrofällungen eine andere Auffassung als berechtigter erscheinen.

Mischt man äquivalente Mengen eines Ferrosalzes und Wasserstoffsuperoxyd, so färbt sich die Lösung rotbraun. Es bildet sich eine komplexe Verbindung $FeSO_4.O_2H_2$, die auf Lackmuspapier stärker sauer reagiert, als die Bestandteile, aus denen sie sich bildet.

Mischt man diese Lösung mit einer Eiweißlösung, z. B. einer Lösung von Wittepepton, so entsteht ein Niederschlag, von dessen Zusammensetzung man sich etwa folgendes Bild machen kann.

$$\left[SO_4 = Fe \begin{matrix} O_2H \\ \diagdown\!\diagup \\ \text{Albumosenreste} \end{matrix}\right] H_x$$

Es ist eine in Wasser unlösliche komplexe Säure. Das komplexe Anion enthält als Zentralatom zweiwertiges Eisen, das mit seinen Hauptvalenzen an SO_4, mit Nebenvalenzen an Wasserstoffsuperoxyd- und Albumosenreste gebunden ist.

Auf Zusatz von Alkali geht der Komplex in Lösung, aber anscheinend nicht unverändert. Vielleicht erfolgt eine Umlagerung, bei der die Albumosenreste durch das Wasserstoffsuperoxyd oxydiert werden.

Ähnliches gilt anscheinend auch für die anderen, durch Ferrosalze und Wasserstoffsuperoxyd in Eiweißlösungen erzeugten Niederschläge.

Fassen wir nunmehr das Wesentliche unserer Überlegungen und unserer Beobachtungen zusammen, so ergibt sich folgendes:

Das Eisen vermag für sich allein in kolloidalen und besonders in eiweißhaltigen Lösungen den molekularen Sauerstoff nicht zu Oxydationen zu befähigen von der Stärke, wie sie im Organismus vor sich gehen.

Zweiwertiges Eisen — und dreiwertiges Eisen, vielleicht stets nach vorheriger Reduktion — bildet in rein wässeriger Lösung und auch in kolloidalen Lösungen unter bestimmten Bedingungen mit Wasserstoffsuperoxyd Verbindungen, die ein verhältnismäßig hohes Oxydationspotential besitzen und die Oxydation von Stoffen vermitteln, die von dem molekularen Sauerstoff nicht oder nur sehr langsam angegriffen werden. Die Reaktion kann nach den Versuchen von Wolf und

Stoecklin[1]) eine katalytische sein und sowohl hierin wie in ihrer Abhängigkeit von Temperatur, Einfluß von H^+ und OH^- die weitgehendste Ähnlichkeit mit der Wirkung der in tierischen und pflanzlichen Geweben vorkommenden Peroxydasen besitzen. Daß dies für die Erforschung des Wesens der Peroxydasen von Bedeutung ist, liegt auf der Hand. Jene komplexen Eisenverbindungen aber als „künstliche Peroxydasen" zu bezeichnen, erscheint uns nicht erlaubt, da dies die Vermutung aufkommen lassen könnte, als ob die Peroxydasen mit den komplexen Eisenverbindungen identisch wären, was um so weniger berechtigt ist, als es nach Ansicht mancher Forscher Peroxydasen gibt, die kein Eisen enthalten.

In den Lösungen bestimmter Eiweißstoffe (Hühnereiweiß, nucleinsaurem Natrium, Albumosen) können Ferrosalze neben Wasserstoffsuperoxyd gelöst bleiben und im Verein mit Wasserstoffsuperoxyd die Oxydation schwerer oxydierbarer Stoffe vermitteln. Bei einem gewissen Mengenverhältnis zwischen Eiweiß, Ferrosalz und Wasserstoffsuperoxyd entstehen Niederschläge von „Oxyferroeiweißverbindungen", die Guajactinktur bläuen, sich also wie Oxygenasen verhalten und bei Gegenwart eines Überschusses von Wasserstoffsuperoxyd Stoffe wie Hydrochinon, Pyrogallol u. a. oxydieren, also ähnlich wie Peroxydasen wirken.

Ob die eingangs erwähnten, von W. Spitzer u. a. untersuchten Oxydationen in der Weise erklärt werden können, daß das in Komplexen befindliche Eisen von Nucleoproteiden den molekularen Sauerstoff „durch Induktion" zu größerer Wirksamkeit befähigt, bedarf weiterer Prüfung. Wahrscheinlicher aber ist die Annahme, daß der durch Säuren in den Organextrakten erzeugte Niederschlag komplexe Verbindungen enthält, die etwa den Oxyferroeiweißverbindungen entsprechen. Man darf annehmen, daß bei der Oxydation autoxydabler Stoffe in den Zellen Wasserstoffsuperoxyd oder organische Peroxyde entstehen. Ersteres kann, wie wir sehen, mit Ferrosalz-Eiweißverbindungen Komplexe von hohem Sauerstoffpotential bilden. Solche „Oxyferroeiweißverbindungen" könnten sich vielleicht auch im Stoffwechsel der Zelle bilden und sie wären es, die die Oxydation dysoxydabler Stoffe vermittelten.

---

[1]) a. a. O.

Es sei aber noch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß nicht nur Eisen- und andere Salze, sondern auch organische Körper Anlagerungsverbindungen mit Wasserstoffsuperoxyd und vermutlich auch mit organischen Peroxyden bilden. Die Bildung von Verbindungen der letzteren Art erklärt vielleicht die Erscheinung der „Katalase".

Bei den Oxydationen in lebenden Zellen kann also vielleicht das Eisen in der geschilderten Weise ein Vermittler von Oxydationen sein. Die Vermittlung könnte aber auch in der Weise geschehen, daß sich aus uns noch unbekannten Stoffwechselprodukten und Wasserstoffsuperoxyd bzw. organischen Peroxyden Komplexverbindungen von hohem Sauerstoffpotential bilden.

Zur Kenntnis der Verbindungen von Ferrisalzen mit Albumosen.

Von

F. Röhmann und T. Shmamine.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 17. Mai 1912.)

Von M. Siegfried wurde im Verein mit R. Adler[1]) und F. Birchard[2]) in sorgfältigster Weise das Verhalten von Proto- und Heteroalbumose zu Eisenammoniakalaun untersucht und der Versuch gemacht, auf Grund der verschiedenen Fällbarkeit eine Trennung beider mit Hilfe dieses Salzes herbeizuführen. Dies erwies sich jedoch als nicht mit Sicherheit ausführbar.

Gelegentlich der im vorhergehenden besprochenen Versuche machten wir die Beobachtung, daß man nicht nur durch Eisenammoniakalaun, sondern auch durch die einfachen ionalen Ferrisalze, durch Eisenchlorid und Ferrisulfat, in der rein wässerigen, nicht Ammonsulfat enthaltenden Lösung von Wittepepton bei vorsichtigem Zusatz einen sich gut absetzenden leicht filtrierbaren und leicht auszuwaschenden Niederschlag gewinnt, der primäre Albumosen enthält. Dieser Niederschlag zeigte, ähnlich wie wir dies für die Oxyferropeptonate fanden, neben Eisen auch einen Gehalt von Schwefelsäure. Auch hier war das Verhältnis von $Fe : SO_4$ im Niederschlag größer als im Fällungsmittel. Das Verhältnis $2\,Fe : 3\,SO_4$ forderte 0,38, gefunden wurden 0,5 und 0,7.

---

[1]) R. Adler, Die Heteroalbumose und Protalbumose des Fibrins. Inauguraldissertation, Leipzig 1907.

[2]) Frederick Birchard, Ein Beitrag zur Kenntnis der Protalbumose des Fibrins. Inaugural-Dissertation, Leipzig 1909.

Der Niederschlag hat ähnlich wie andere im Wasser unlösliche Metalleiweißverbindungen[1]) den Charakter einer in Wasser unlöslichen Säure, insofern er auf Zusatz von Alkali mit einer für Curcumapapier neutralen Reaktion in Lösung geht.

Im Unterschied zum Oxyferropeptonat läßt sich das Eisen aus dem Ferropeptonat durch Alkalien leicht abscheiden. Setzt man zur alkalischen Lösung einen Überschuß von Alkali, so fällt Eisenhydroxyd aus, während die Albumosen gelöst bleiben. Dieses Verhalten benutzten bereits M. Siegfried und seine Schüler, indem sie die von ihnen erhaltenen Eisenniederschläge mit Ammoniak zerlegten.

Sehr glatt gelingt die Zersetzung mit Baryt. Das Eisen scheidet sich als Eisenhydroxyd, die Schwefelsäure als Bariumsulfat ab. Die Albumosen aber gehen als Bariumverbindnngen in Lösung. Entfernt man einen etwaigen Überschuß von Baryt durch Kohlensäure, so läßt sich das Barium aus der Albumosenlösung durch sehr vorsichtigen Zusatz von entsprechend verdünnter Schwefelsäure ausfällen. Hierbei scheidet sich ein Teil der Albumosen mit dem Bariumsulfat zusammen aus, während ein anderer Teil in Lösung bleibt. Der unlösliche Teil löst sich sehr leicht in einem Überschuß sowohl von Alkali (Barythydrat), wie sehr verdünnter Schwefelsäure wieder auf. Die Bariumverbindung ist durch Alkohol fällbar. Dieses Verhalten, nämlich daß gewisse Albumosen in Wasser unlöslich sind, mit Basen (im besonderen Barium) und verdünnten Säuren lösliche salzartige Verbindungen bilden, scheint uns bisher nicht genügend beachtet und für die Trennung der Albumosen nicht genügend ausgenutzt zu sein. Es liegt aber nicht in unserer Absicht, weitere Versuche nach dieser Richtung hin anzustellen. Das Verhalten, welches die aus dem Ferriniederschlage wiedergewonnen Albumosen zeigten, sprach für ein Gemenge von Proto- und Heteroalbumosen.

Versuch 1. 10 ccm 5 %iger Lösung von „Pepton Witte“ werden mit 6,4 ccm einer 0,221 %igen Eisenchloridlösung versetzt. Nach 25 Minuten wird filtriert. Das klare Filtrat gibt mit Eisenchlorid keine Fällung. Es sind gefällt worden 13,5 % des N der Peptonlösung.

---

[1]) Siehe z. B. F. Röhmann u. L. Hirschstein, Über die Silberverbindungen des Caseins. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 288, 1903.

Versuch 2. 60 ccm 5%iger Peptonlösung werden mit 6 ccm einer 2,43%igen Lösung von Ferriammonsulfatlösung versetzt. In den Niederschlag gehen 14,7% des Gesamt-N, in einem anderen Versuch 16,2%.

Versuch 3. 8. II. 10. 800 ccm einer 5%igen Peptonlösung werden mit 195 ccm einer 10%igen Eisenammoniakalaunlösung gefällt, Fällung mit Wasser gewaschen, mit Alkoholäther lufttrocken. Ausbeute 7,2 g.

Wassergehalt 14,01%. In der Trockensubstanz: 43,7% C, 4,95% H, 13,1% N, 12,85% SO_4, 6,5% Fe. $Fe : SO_4 = 0{,}50$.

1,1099 der lufttrockenen Substanz lösen sich in etwa 21,2 ccm $^1/_4$ n-NaOH (1 ccm = 6,2 mg Na). Auf Zusatz von verdünnter Salzsäure entsteht wieder ein Niederschlag, der sich im Überschuß der Salzsäure löst. Bei Zusatz von $CaCO_3$ oder $BaCO_3$ erfolgt keine Abscheidung von Eisen, auch nicht beim Erhitzen mit essigsaurem Natrium, aber auf Zusatz überschüssiger Natronlauge. Das Filtrat dieses Niederschlages gibt Albumosenreaktionen.

Versuch 4. 27. VI. 11. 30 g Pepton Witte werden in 300 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst. Zu der filtrierten Lösung werden etwas mehr als 20 ccm 3,6%ige Ferrisulfatlösung hinzugefügt und am folgenden Tage filtriert; Niederschlag mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Ausbeute 2,2 g.

Gewichtsverlust im Vakuum unter P_2O_5: 11,2%.

In Trockensubstanz 46,5% C, 7,0% H, 14,9% N, 5,08% Fe, [3,84% SO_4].

In einem ähnlichen Versuch vom 15. IX. 11 betrug in der lufttrockenen Substanz der Gehalt an Fe 3,5%, an SO_4 4,97%. Verhältnis $Fe : SO_4 = 0{,}7$.

Versuch 5. 22. IX. 11. 100 g Pepton Witte werden in 1 l heißem Wasser gelöst. Die Lösung wird filtriert und nach dem Abkühlen mit 3,6%iger Lösung von Ferrisulfat vollkommen ausgefällt.

Der Niederschlag wird mit Wasser gewaschen und noch feucht mit Barytwasser verrieben, bis Curcumapapier eben gebräunt wird. Es bildet sich zunächst eine kolloidale Lösung. Auf Zusatz von wenig Essigsäure entsteht eine flockige Fällung. Niederschlag und Flüssigkeit werden durch Zentrifugieren und Filtrieren getrennt, indem der Niederschlag wiederholt mit sehr verdünntem Barytwasser extrahiert wird. Die vereinigten Extrakte werden mit verdünnter Essigsäure angesäuert, auf dem Wasserbad eingeengt. Durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure wird der Baryt vollkommen ausgefällt. Das klare Filtrat rötet blaues Lackmoidpapier schwach, bläut Kongopapier nicht. Es wird eingeengt und mit dem doppelten Volumen 94% Alkohol gefällt.

a) Fällung, bei Behandlung mit warmem Wasser bleibt

α) in Wasser ungelöst anscheinend der größte Teil. Er wird in Barytwasser gelöst, filtriert und mit Methylalkohol gefällt. Der Niederschlag wird mit Alkohol und Äther in Pulverform übergeführt.

Auf Trockensubstanz berechnet 14,8% N, 11,7% Ba, auf Ba-freie Substanz berechnet 16,8% N, mit Na_2CO_3 verascht kein Chlor, minimale Spuren von SO_4.

β) Der lösliche Teil wird mit Äthylalkohol unter Zusatz eines Tropfens gesättigter ClNa-Lösung gefällt. Der lufttrockene Niederschlag enthält 2,7 % Asche, kein Ba, unter Zusatz von Na_2CO_3 verascht, Spur SO_4 auf aschefreie Substanz berechnet

50,7 % C, 7,3 % H, 17,5 % N.

b) Filtrat wird eingeengt, mit Alkohol gefällt

α) Fällung: 1,65 g in 30 ccm Wasser gelöst. Die etwas trübe Lösung wird auf Zusatz von Salzsäure zunächst klar, auf weiteren Zusatz von Salpetersäure tritt eine Fällung ein, die sich beim Erwärmen löst, beim Erkalten wieder erscheint. Millons Reaktion stark, Schwefelreaktion und Tryptophanreaktion stark, α-Naphtolreaktion negativ.

Fraktionierte Fällung nach F. Hofmeister

2 ccm obiger Albumosenlösung in 10 ccm

Ammonsulfat	5 ccm Filtrat + 0,2 Ammonsulfat.
2,2 Opalescenz der Lösung 2,3 stärkere Opalescenz 2,4—3,8 allm.stärk.Opalescenz	Trübung
4,0 „ „ „	klar
4,2—4,4 „ „ „ 5,0 sofort Niederschlag	klar, beim Stehen äußerst geringe Opalescenz
5,6 „ „	klar, beim Sättigen mit Ammonsulfat stärkere Opalescenz
6 „ „	noch Biuretreaktion.

Versuch 6. 11. XI. 11. Durch Ferrisulfat in Wittepepton erzeugter Niederschlag, von verschiedenen Darstellungen herrührend. 4,5 g werden mit Barytwasser verrieben, bis die Reaktion auf Curcuma schwach braun bleibt.

I. Das klare, weingelbe Filtrat wird mit 1 Tropfen Essigsäure für Curcuma eingesäuert und auf dem Wasserbade eine Zeitlang erwärmt. Dann wird der in Lösung befindliche Baryt durch vorsichtigen Zusatz von $^1/_4$ Normalschwefelsäure ausgefällt. Hierbei scheidet sich mit dem schwefelsauren Baryt eine kleine Menge Albumosen aus. Es wird heiß filtriert. Die Flüssigkeit bläut rotes Lackmoidpapier nicht mehr und beginnt blaues zu röten.

a) Die in Wasser unlöslichen Albumosen lösen sich in sehr verdünnter Schwefelsäure. Die klare Lösung gibt starke Biuretreaktion, mit Salpetersäure, Essigsäure und Kochsalz, Essigsäure und Ferrocyankalium starke Fällungen, die sich beim Erwärmen lösen. Tryptophanreaktion stark, Millons Reaktion positiv, α-Naphtolreaktion fast negativ.

b) Das Filtrat wird eingedampft, noch einmal filtriert, auf 15 ccm eingeengt und mit 30 ccm Alkohol gefällt.

α) Alkoholniederschlag abfiltriert, mit Alkohol und Äther leicht in Pulverform überzuführen. 1 g wird in 10 ccm Wasser gelöst, auf Zusatz von 10 ccm Alkohol Opalescenz, auf Zusatz von weiteren 10 ccm Alkohol Niederschlag. Er ist frei von Barium und Schwefelsäure. Enthält in Trockensubstanz 49,04 % C, 7,16 % H, 17,1 % N.

β) Alkoholfiltrat wird eingedampft und mit dem 10 fachen Volumen Alkohol gefällt. Die Flüssigkeit ist weißlich opalescent und scheidet erst auf Zusatz einiger Tropfen Chlornatriumlösung einen Niederschlag vollkommen ab. In Wasser gelöst gibt dieser starke Schwefel- und Tryptophanreaktion, Millons Reaktion und α-Naphtolreaktion schwach.

c) Das Filtrat der Alkoholfällung b ward eingeengt und mit Alkohol gefällt. Fällung in Wasser gelöst gibt Millons Reaktion, Tryptophanreaktion und Schwefelreaktion stark, α-Naphtolreaktion negativ.

II. Der mit kaltem Barytwasser behandelte Rückstand wird noch einmal mit heißem Barytwasser übergossen. Das stark alkalische Filtrat wird mit verdünnter Essigsäure angesäuert. Hierbei tritt eine Trübung ein und Geruch nach H_2S. Die Flüssigkeit wird eingeengt und heiß mit $^1/_4$ Normalschwefelsäure versetzt, bis blaues Lackmoidpapier sich zu röten beginnt.

a) Niederschlag abfiltriert und mit 1 ccm $^1/_4$ Normalschwefelsäure extrahiert. Das klare Filtrat trübt sich auf Zusatz von von $^1/_4$ n-NaOH tark. Die Trübung löst sich in einem Überschuß der Natronlauge sehr leicht auf. Mit HNO_3, Essigsäure-ClNa Fällung, die bei Erwärmen löslich usw. Millons Reaktion positiv, Tryptophanreaktion stark.

h) Filtrat auf 20 ccm eingeengt, mit 10 ccm Alkohol.

α) Niederschlag mit wenig Alkohol gewaschen. Bei Behandlung mit Wasser löst sich ein kleiner Teil mit einer für Lackmus sauren Reaktion auf. Mit Essigsäure ClNa-Fällung, die sich bei Erwärmen löst usw. Die Hauptmenge bleibt ungelöst und löst sich bei Zusatz von $^1/_4$ n-NaOH, von der eine gewisse Menge erforderlich ist, ehe die Reaktion für Curcuma alkalisch wird. Millons Reaktion schwach, Glyoxalreaktion kirschrot, starke Schwefelreaktion.

β) Filtratrückstand in Wasser leicht löslich, enthält noch Barium. Albumosenreaktionen.

Untersuchungen betreffend das Vorkommen eines cholesterinspaltenden Fermentes in Blut und Leber.

Von

J. H. Schultz.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 17. Mai 1912.)

In der auf Anregung und unter Leitung von F. Röhmann ausgeführten Arbeiten von Kenro Kondo[1]) ist bereits der Versuch gemacht worden, die Frage nach dem Vorkommen eines cholesterinesterspaltenden Fermentes in Blut und Geweben zu entscheiden. Kondo suchte mit Hilfe der Acetylzahl festzustellen, ob bei der Digestion von Blut und Organen aus den in ihnen enthaltenen bzw. aus zugesetzten Cholesterinestern Cholesterin frei wird. Er stieß aber hierbei auf Schwierigkeiten, die dadurch bedingt waren, daß neben Cholesterin andere acetylierbare Substanzen, anscheinend Oxysäuren, entstanden. Diese Schwierigkeiten werden durch die inzwischen veröffentlichte Methode von Windaus[2]) umgangen. Ich habe mich daher gerne auf Anregung von Herrn Prof. Röhmann obiger Frage von neuem zugewandt, besonders auch, um mit den hierbei gewonnenen Erfahrungen später dem Verhalten der Lipoide im syphilitischen Serum und in den Antigenextrakten der Wassermannschen Reaktion näher zu treten.

Versuchsanordnung.

Es wurden bestimmt im Gesamtblut, im Blutserum bzw. Blutplasma, in der Leber und in Gemischen von Blut und Leberbrei

[1]) Diese Zeitschr. **26**, 243, 1910.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 110, 1910.

bzw. Leberextrakten vor und nach 48 stündigem Stehen in der Wärme, das unter Zusatz von Fluornatrium bzw. Chloroformthymol erfolgte, die Gesamtmenge des Cholesterins und die Menge des freien Cholesterins, und zwar nicht unmittelbar im Alkoholextrakt, sondern in seinem, in Essigäther bei Zimmertemperatur löslichen Anteil.

Blut bzw. Leber wurden mit der 3 bis 4 fachen Menge Alkohol gefällt. Gemische von Blut und Leberextrakten wurden nach Zusatz von verdünnter Salzsäure bis zur schwachen Bläuung von rotem Lackmoidpapier durch Erhitzen koaguliert und filtriert. Das erste Filtrat wurde in beiden Fällen auf dem Wasserbade in flacher Schale abgedampft. Die durch Alkohol bzw. Erhitzen erhaltenen Koagula wurden mit Alkohol ausgekocht, bis eine Probe auf Zusatz von Wasser keine Trübung mehr zeigte. Der Alkohol wurde abdestilliert. Die vereinigten Rückstände wurden auf dem Wasserbade in einer Schale vorsichtig bis zum Sirup eingeengt, mit heißem Alkohol aufgenommen und dieser durch einen Trichter, der in einer von Wasserdampf durchströmten Zinnschlange ruhte, filtriert. Der Alkohol wurde abdestilliert, der Rückstand (wenn nötig nach noch einmaligem Aufnehmen mit Alkohol) in heißem Essigäther gelöst. Die Lösung wurde heiß filtriert und 24 Stunden stehen gelassen. Hierbei schied sich die „Lecithinfraktion" als wachsartige Masse ab. Der Essigäther wurde abfiltriert und das Ungelöste wiederholt mit Essigäther behandelt. Von der so gewonnnnen „Fett-Cholesterinfraktion" wurde der Essigäther abdestilliert, der Rückstand im Leuchtgasstrome getrocknet und in 30 ccm Äther gelöst. Hiervon dienten ein Drittel zur Bestimmung des freien Cholesterins nach Windaus. Da Äther das Digitonin fällt, wurden die 10 ccm der ätherischen Lösung mit 15 ccm Alkohol versetzt und auf dem geschützten Wasserbad erwärmt, bis die aufsteigenden Dämpfe nicht mehr nach Äther rochen. Dann erfolgte in der Wärme der Zusatz der Digitoninlösung usw.

In den übrigen Zweidritteln wurde durch Titrieren mit alkoholischer Kalilauge und Phenolphtalein als Indicator die Acidität bestimmt. Dann wurde verseift und durch Ausschütteln mit Petroläther das Gesamtcholesterin gewonnen und gewogen.

Die gefundenen Werte sind auf 100 ccm berechnet. Q.-Ch. bedeutet das Verhältnis von freiem Cholesterin zu Gesamtcholesterin, den „Cholesterinkoeffizienten".

Versuche.

a) Menschenblut.

Versuch 1. In einem Meßzylinder, der 12 ccm einer 25 %igen Fluornatriumlösung enthält, werden aus der Armvene von 3 Personen 420 ccm aufgefangen. Von diesen werden 200 ccm sofort mit 600 ccm 94 %igen Alkohol gefällt, 200 ccm ebenso gefällt, nachdem sie 24 Stunden bei 37° gestanden haben.

	Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
frisch	0,1352	0,093	69,8
idgeriert	0,1244	0,073	58,8

Versuch 2 ähnlich Versuch 1.

	Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
frisch	0,1525	0,079	53,3
digeriert	0,1130	0,074	66,0

Versuch 3. Die digerierte Probe ging verloren.

	Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
frisch	0,0878	0,059	60,8

Bei der Autolyse des Gesamtblutes vom Menschen ließ sich eine Spaltung von Cholesterinestern nicht wahrnehmen. Die Werte für den Cholesterinkoeffizienten schwanken vielleicht entsprechend der noch unvollkommenen Beherrschung der Methode.

Beiläufig seien hier einige Bestimmungen von Cholesterinestern und Cholesterin im Blutserum von Menschen angeführt, welche gemacht wurden im Hinblick auf die Bedeutung, welche nach bekannten Beobachtungen die Lipoide und im besonderen das Cholesterin für das Zustandekommen der Wassermannschen Reaktion besitzen.

Zu den Bestimmungen dienten aktive und inaktive Sammelsera mit positiver bzw. negativer Wassermannscher Reaktion, die von Frl. Margarete Stern in der serologischen Abteilung der Dermatologischen Klinik des Herrn Geheimrat Neißer für mich gesammelt worden waren. Sie stammten von etwa 30 verschiedenen Personen. In diesen Versuchen wurde auch der in Essigäther unlösliche Teil des Alkoholextraktes, die „Lecithinfraktion", gewogen.

	100 ccm enthalten			
	Lecithin	Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
92,5 ccm Serum aktiv (Wassermann negativ) .	0,078	0,1372	0,0244	16
89 ccm Serum aktiv (Wassermann positiv) .	0,1483	0,1389	0,0522	37
90 ccm Serum inaktiv (Wassermann negativ) .	0,1824	0,1199	0,0149	12
97,6 ccm Serum inaktiv (Wassermann positiv) .	0,1402	0,0781	0,0138	18

Die Versuche zeigen zunächst, daß das Blutserum neben Cholesterinestern regelmäßig eine gewisse Menge freies Cholesterin enthält. Daß der Cholesterinkoeffiizient kleiner als im Gesamtblut ist, beruht darauf, daß nach den Versuchen Hepners[1]) die roten Blutkörperchen nur Cholesterin und keine Cholesterinester enthalten.

Der Cholesterinkoeffizient war in dem Sammelserum mit positiver Wassermannscher Reaktion größer als in dem mit negativer. In der inaktivierten Probe war die Zunahme nur gering. Die absoluten Werte zeigen aber in diesen Proben noch Schwankungen, durch die die Sicherheit in der Beurteilung des Resultates beeinträchtigt wird.

b) Pferdeblut.

Auch in einem Versuch mit Pferdeblut erfolgte keine Spaltung der Cholesterinester.

Versuch 4. 200 ccm Pferdeblut wurden in 600 ccm Alkohol sofort aufgefangen, 200 ccm unter Zusatz von 100 ccm Wasser und 3 ccm 10%iger alkoholischer Thymollösung 30 Stunden in der Wärme stehen gelassen.

	Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
frisch	0,0978	0,058	59,6
digeriert	0,0628	0,035	60,0
Versuch 5.			
frisch	0,2847	0,1545	54,2

Eine Bestimmung von Cholesterinestern und Cholesterin im Oxalatplasma ergab, daß auch dieses nicht unbeträchtliche Mengen freies Cholesterin enthält:

Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
0,0464	0,0198	42,7

Diese Beobachtungen über das Fehlen eines cholesterinesterspaltenden Fermentes im Blute stehen in Übereinstimmung mit den Angaben Kondos[2]).

c) Kaninchenleber.

Versuche mit Kaninchenleber fielen ebenfalls negativ aus.

Versuch 6. 2 kräftige Kaninchen werden aus der Carotis entblutet. Die Leber A des einen wird sofort grob zerschnitten in kochenden Alkohol gelegt, die Leber B des anderen aseptisch entnommen und in

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 73, 595, 1898.
[2]) Diese Zeitschr. 27, 436, 1910.

einem sterilen Glasgefäß 24 Stunden liegen gelassen. Sie zeigte keine Fäulniserscheinungen.

	Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
Leber A frisch	0,368	0,287	77,8
Leber B autolysiert . .	0,223	0,174	76,4

Die Menge des freien Cholesterins ist auffallend groß im Vergleich zu dem Gehalt an Cholesterinestern. Eine Zunahme des freien Cholesterins bei der Autolyse war nicht nachweisbar. Dasselbe war der Fall im folgenden Versuche.

Versuch 7. Die Lebern zweier Kaninchen werden zerschnitten und im Mörser zerquetscht. 60 g werden alsbald gefällt, 54,5 g mit 50 ccm 10%iger Fluornatriumlösung im sterilen Gefäß 48 Stunden bei 37° autolysiert.

	Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
Leber frisch	0,431	0,266	61,5
Leber autolysiert . . .	0,315	0,182	57,7

d) Pferdeleber.

Im Gegensatze zu den beiden Versuchen mit Kaninchenleber zeigte sich bei der Autolyse von Pferdeleber eine sehr deutliche Zunahme des freien Cholesterins auf Kosten der Cholesterinester.

Versuch 8. Frische Pferdeleber wurde durch die Fleischmaschine geschickt. Vom Brei wurden 200 g sofort gefällt und 200 g mit 400 ccm 1%iger Fluornatrium- und 2 ccm 10%iger Thymollösung 72 Stunden in der Wärme stehen gelassen.

	Gesamt-Cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
Leber frisch	0,3684	0,1734	47,0
Leber digeriert . . .	0,3113	0,2646	85,1

e) Blut und Leber.

Eine noch weitergehende Spaltung, bei der z. T. eine fast vollständige Zerlegung aller vorhandenen Cholesterinester erfolgte, wurde erhalten, als Pferdeleber mit Pferdeblut angesetzt wurde.

Versuch 9. Von 600 ccm Pferdeblut, die 1% Fluornatrium enthielten, wurden 200 ccm sofort gefällt. 200 ccm blieben, mit 100 ccm Wasser versetzt, 48 Stunden in der Wärme stehen, 200 ccm wurden mit 100 ccm Leberbrei aufgestellt, und 100 ccm Leberbrei (enthaltend 50 g Leber) wurden sofort mit Alkohol gefällt.

	Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
Blut frisch	0,0978	0,058	59,6
Leber frisch	0,247	0,151	62,9
Blut autolysiert . . .	0,0629	0,035	55,6
Blut und Leber autol.	0,1209	0,1129	93,7

Versuch 10. Frische Pferdeleber wird durch die Fleischmaschine geschickt, auf 1 g mit 1 ccm Chloroformwasser angerührt und durch Gaze abgepreßt. 200 ccm des Extraktes werden mit 400 ccm FNa-Pferdeblut vermischt. Hiervon wird die eine Hälfte sofort mit Alkohol gefällt, die andere nach Zusatz von Thymol für 48 Stunden in die Wärme gestellt.

		Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
Blut-Lebergemisch	frisch . .	0,0654	0,0444	67,7
„	autolysiert	0,0746	0,0625	80,7

Versuch 11 wie der vorhergehende, nur mit dem Unterschiede, daß zur Extraktion der Leber 1%ige Fluornatriumlösung benutzt wird.

		Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
Blut-Lebergemisch	frisch . .	0,0812	0,0552	70,0
„	autolysiert	0,0684	0,0552	83,3

Versuch 12 wie Versuch 11.

		Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
Blut-Lebergemisch	frisch . .	0,1439	0,0827	57,2
„	autolysiert	0,1439	0,1427	99,2

Weniger groß, aber immerhin noch deutlich war die Spaltung in dem folgenden Versuche mit Rinderleber und Rinderblut.

Versuch 13. Versuchsanordnung wie oben.

		Gesamt-cholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
Blut-Lebergemisch	frisch . .	0,0943	0,0402	41,9
„	autolysiert	0,0973	0,0569	58,8

Die Versuche zeigen also mit völliger Sicherheit, daß in einem Gemisch von Blut und Leberbrei beim Pferde und anscheinend auch beim Rinde die Cholesterinester mehr oder weniger vollkommen gespalten werden. Auch sie lassen sich mit den Beobachtungen Kondos gut vereinbaren.

Auffallenderweise fand die Spaltung nicht statt, als zum Digestieren nicht Gesamtblut, sondern Blutplasma, bzw. Blutserum benutzt wurde.

Versuch			Gesamtcholesterin	Freies Cholesterin	Q.-Ch.
14	100 g Pferdeleber	frisch	0,0804	0,0335	42,1
	400 g Oxalatplasma vom Pferde	digeriert	0,0824	0,0321	38,6
15	ebenso	frisch	0,0554	0,0247	44,6
	ebenso	digeriert	0,0554	0,0308	55,5
16	ebenso	frisch	0,0642	0,0335	55,7
	ebenso	digeriert	0,0630	0,0262	41,7
17	100 g Leber } vom	frisch	0,0736	0,0200	27,1
	200 g Blutserum } Pferde	digeriert	0,0848	0,0154	18,1
18	100 g Leber } vom	frisch	0,1100	0,0395	35,9
	200 g Blutserum } Rinde	digeriert	0,0964	0,0347	36,0

Hier schwankten die Werte für den Cholesterinkoeffizienten mehr oder weniger innerhalb der durch das Verfahren bedingten Fehler. Auch Kondo fand in einem Versuche, daß bei der Digestion von Hundeleber mit Hundeblut keine Zunahme der acetylierbaren Substanz eintrat. Dagegen war dies der Fall bei der Digestion von Pferdeblutplasma mit Rindsleber. Diese Beobachtungen sollen den Ausgangspunkt für weitere Versuche bilden, die von anderer Seite angestellt werden.

Ein Respirationsapparat.

Von

Hans Murschhauser.

(Aus dem Laboratorium der akademischen Kinderklinik in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 11. Mai 1912.)

Mit 1 Tafel und 2 Figuren im Text.

Bei der Ausführung der schon vor ca. 3 Jahren erschienenen Arbeit: „Über die Beziehungen der Körperoberfläche zum respiratorischen Stoffwechsel" bediente sich H. Kettner[1]) eines einfachen Respirationsapparates, zu dem ich ein Absorptionsgefäß konstruiert hatte, durch das die Absorption der totalen, in 24 Stunden von einem Meerschweinchen ausgeschiedenen Kohlensäure durch Kalilauge bei lebhafter Ventilation ermöglicht wurde. Im Prinzip war der Apparat nach dem zweiten von Lavoisier gegebenen Schema gebaut, nach dem ein durch den Atmungsraum geschickter Luftstrom die von dem Tiere ausgeschiedene Kohlensäure mit sich reißt und bei der Passage durch die Absorptionsmittel an jene abgibt.

Unsere fortgesetzten Studien auf dem Gebiete des Gasstoffwechsels stellten mit der Zeit erhöhte Anforderungen an die Apparatur, und bei der zunächst beabsichtigten Aufgabe, den Einfluß äußerer Faktoren, namentlich extremer Außentemperaturen und Feuchtigkeitsgrade, auf den Gaswechsel des Tieres und seine Beziehungen zur Körperoberfläche zu ermitteln, war in erster Linie die Frage zu erörtern, ob es zweckmäßig sei, an dem alten von uns verwendeten Prinzip festzuhalten oder nach einem anderen zu greifen. In die Erwägung mußte ein Moment von hoher Bedeutung eingeflochten

[1]) H. Kettner, Die Beziehungen der Körperoberfläche zum respiratorischen Stoffwechsel. Arch. f. Anat. u. Phys., Phys. Abt. 1909, S. 454.

werden, die bewährte Kohlensäurebestimmung durch eine gleichwertige Ermittelung des verbrauchten Sauerstoffes zu ergänzen.

Der Einfluß der Außentemperatur auf den Gasstoffwechsel ist schon des öfteren Gegenstand der Untersuchung gewesen und an Apparaten zum Studium dieser Beziehungen fehlt es ebensowenig wie an Bemängelungen, die von den verschiedensten Seiten gegen dieselben ausgesprochen wurden.

Bei der Durchsicht der hierauf bezugnehmenden Literatur fällt auf, daß, soweit Tierversuche in Frage kommen — die für Versuche an Menschen gebauten Apparate können hier nur gelegentlich gestreift werden, da eine detaillierte Beschreibung zu weit führen würde — besonders anfänglich gerade jene Methoden sich einer besonderen Bevorzugung erfreuten, bei denen man die Tiere in Schnauzenkappen atmen ließ oder tracheotomierte. Was die Verwendung von Schnauzenkappen betrifft, so ist von den verschiedenen Gegnern dieses Prinzips und zwar mit Recht hervorgehoben worden, daß es sehr schwer fällt, mit diesen einen wirklich sicheren Luftabschluß zu erzielen. Und wenn auch Sanders-Ezn[1]) und Ludwig den Raum zwischen Kopf und Kappe mit Fett verstrichen haben, so konnten sie damit bei den in ihren Versuchen eingetretenen Druckschwankungen die Gefahr des Undichtwerdens doch nicht dauernd beseitigen. Tatsächlich vermochte Pflüger[2]) nachzuweisen, daß die von den beiden Autoren gefundenen Zahlen für den Sauerstoff zu hoch und mit einem bis zu 100% betragenden Fehler behaftet sind, während die für die Kohlensäure gefundenen zu niedrig ausfielen. Aus demselben Grunde dürften die Versuche von Regnard[3]) mit großer Vorsicht zu verwerten sein. Es kann ferner keinem Zweifel unterliegen, daß die Maskierung bei den Tieren ein Gefühl der Angst und Unbehaglichkeit erwecken und deshalb eine gewisse Unruhe der Tiere im Gefolge haben mußte; denn wenn schon, um eine Analogie in der Methodik anzuführen, die Verwendung von Nasenklemmen und das Atmen durch ein Mundstück bei Menschen auf Schwierigkeiten stoßen ließ, gegen die in vielen Fällen nur die zielbewußte Energie des Forschers siegreich ankämpfte, so darf es nicht verwundern, wenn die Tiere, die obendrein einer Belehrung unzugänglich sind, sich dieser Behandlung so widersetzten, daß sie während des Versuches gefesselt werden mußten. Die Fesselung zieht aber einerseits nach den Feststellungen von Speck[4]) schwere Ernährungsstörungen (Fesselungsdiabetes) nach sich, andererseits müssen die heftigen Anstrengungen, die gefesselte Tiere

[1]) Sanders-Ezn, Ber. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss. zu Leipzig, math.-phys. Klasse, **19**, 58, 1867.

[2]) E. Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiol. **12**, 283.

[3]) P. Regnard, Recherches expérimentales sur les variations pathologiques des combustions respiratoirs. Paris 1879.

[4]) Speck, Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf den Stoffwechsel. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **15**, Heft 1, S. 8, 1879.

machen, um sich zu befreien, die Resultate trüben. Ein weiterer Nachteil, der dieser Methodik anhaftet, besteht darin, daß sie nur kurzdauernde Versuche gestattet. Diese beiden letzten Einwände müssen auch, wie schon Speck[1]) betont hat, gegen die Versuche an tracheotomierten Tieren, wie sie von Röhrig und Zuntz[2]) ausgeführt wurden, erhoben werden, und gegen die Versuche von Pflüger[3]) an tracheotomierten aufgebundenen Kaninchen, die in Bäder verschiedener Temperaturen gebracht wurden, sind die gleichen Aussetzungen zu wiederholen.

Die Methoden, bei denen Maske oder Mundstück zur Verwendung kommen, sind beim Menschen, wenn er sich erst einmal an die veränderte Atemmechanik gewöhnt hat, namentlich in der Form, wie sie von Zuntz[4]) angegeben, zur Feststellung schnell verlaufender Variationen im Stoffwechsel wie keine andere geeignet, und die meisten bis jetzt vorliegenden Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen körperlicher Arbeit und Gasstoffwechsel sind gerade mit dieser Methodik ausgeführt worden. Gegen ihre Verwendung bei Tieren müssen die erwähnten Bedenken aufrechterhalten werden, da sich die Muskeltätigkeit durch Fesselung nicht ausschließen läßt, sondern durch Aufsetzen von Kappen und Fesseln vielmehr provoziert wird, während das frei im kleinen Raume eingeschlossene Tier sich meist kaum bewegt. Das geht schon aus einem Vergleich der Resultate, die die beiden Methoden zeitigten, hervor. Denn während Colasanti[5]) in seinen Versuchen an Meerschweinchen, die frei im Raume saßen, ganz mäßige Schwankungen im respiratorischen Quotienten erhielt, weisen die Versuche anderer Autoren, von denen unter sonst gleichen Bedingungen Fesselung angewandt wurde, kolossale Verschiebungen desselben auf. Für Atmungsversuche an Tieren in fast allen Fällen, und beim Menschen dann, wenn es sich um Untersuchungen handelt, wo der Tagesumsatz festgestellt werden soll, ist es nötig, nach dem Prinzip von Regnault-Reiset[6]) oder Pettenkofer[7]) zu verfahren. Bei den beiden ursprüng-

---

[1]) Speck, Untersuchungen über die Einwirkung der Abkühlung auf den Atemprozeß. Arch. f. klin. Med. **33**, 380, 1883.

[2]) Röhrig und Zuntz, Zur Theorie der Wärmeregulation. Arch. f. d. ges. Physiol. **4**, 57, 1871.

[3]) Pflüger, Untersuchungen über Wärme und Oxydation der lebenden Materie. Arch. f. d. ges. Physiol. **18**, 247.

[4]) A. Magnus-Levy, Über die Größe des respiratorischen Gaswechsels unter dem Einfluß der Nahrungsaufnahme. Arch. f. d. ges. Physiol. **55**, 1, 1893.

[5]) Colasanti, Über den Einfluß der umgebenden Temperatur auf den Stoffwechsel der Warmblüter. Arch. f. d. ges. Physiol. **14**, 93, 1877.

[6]) Regnault et Reiset, Recherches chimiques sur la respirations des animaux des diverses classes. Annales de chim. et de phys., 3e série, **26**, 299—519, 1849.

[7]) M. Pettenkofer, Über die Respiration. Ann. d. Chem. u. Pharmaz., II. Suppl.-Bd., S. 1 bis 52, 1862.

lichen Methoden und deren späteren Variationen atmet das Versuchsobjekt frei ohne Maske oder dergleichen in einer Kammer, die ventiliert wird. Aber während die Apparate nach dem Prinzip von Regnault-Reiset ein vollständig in sich abgeschlossenes System bilden, in dem die ausgeatmete Kohlensäure durch Absorptionsmittel entfernt und der verbrauchte Sauerstoff durch Zufuhr neuer Mengen von außen immer wieder ergänzt wird, streicht beim Pettenkoferschen System ein konstanter Luftstrom durch den Atmungsraum, von dessen Abzugsrohr ein Teil des Hauptstromes zur Analyse entnommen wird. Mit dem Fortschritt der Technik haben beide Systeme im Laufe der Zeit einen hohen Grad der Vervollkommnung erfahren. Apparate kleineren Maßstabes nach dem Prinzip von Regnault-Reiset sind von Hoppe-Seyler[1]), Pflüger[2]), Zuntz und Oppenheimer[3]), Krogh[4]), sowie von Schulz[5]), Seegen und Nowak[6]), Rosenthal[7]) und Nagai[8]) konstruiert worden. Sie ermöglichen alle mit mehr oder minder großer Genauigkeit eine gleichzeitige Bestimmung der gesamten, während eines Versuches ausgeschiedenen Kohlensäure und des gesamten verbrauchten Sauerstoffes. Die Kohlensäure wird dabei zum allergrößten Teil von den alkalischen Absorptionsmitteln aufgenommen und darin quantitativ, sei es durch direkte Wägung der Absorptionsgefäße oder durch Analyse der Absorptionsmittel, bestimmt. Der in der Luft verbliebene Rest an Kohlensäure, der durch Analyse der Endluft ermittelt wird, ist zu dem in der Lauge gefundenen zu addieren; die Menge des verbrauchten Sauerstoffes berechnet sich aus dem Volumen des aus dem Gasometer verdrängten Sauerstoffes und der Analyse der Endluft.

---

[1]) N. Stroganow, Beiträge zur Kenntnis des Oxydationsprozesses usw. Arch. f. d. ges. Physiol. **12**, 18ff., 1876.

[2]) Colasanti, l. c. S. 92, 1877. — Finkler, Beiträge zur Lehre von der Anpassung der Wärmeproduktion an den Wärmeverlust usw. Arch. f. d. ges. Physiol. **15**, 603, 1877.

[3]) N. Zuntz, Ein nach dem Prinzip von Regnault und Reiset gebauter Respirationsapparat. Arch. f. (Anatom. u.) Physiol., Suppl. 431, 1905. — C. Oppenheimer, Über die Frage der Anteilnahme elementaren Stickstoffes usw. Diese Zeitschr. **4**, 328ff., 1907.

[4]) A. Krogh, Experimentelle Untersuchungen über die Ausscheidung freien Stickstoffes. Sitzungsber. d. Wien. Akad., math.-naturw. Kl. 115, Abt. 3, S. 571ff., 1906.

[5]) H. Schulz, Über das Abhängigkeitsverhältnis zwischen Stoffwechsel und Körpertemperatur. Arch. f. d. ges. Physiol. **12**, 78ff., 1877.

[6]) Seegen und Nowak, Versuche über die Ausscheidung von gasförmigem Stickstoff usw. Arch. f. d. ges. Physiol. **19**, 347ff., 1879.

[7]) Rosenthal, J., Calorimetrische Untersuchungen. Arch. f. (Anatom. u.) Physiol. **1894**, 246.

[8]) H. Nagai, Der Stoffwechsel des Winterschläfers. Zeitschr. f. allg. Physiol. **9**, 243ff., 1909.

Der ursprüngliche Pettenkofersche Apparat gestattete die Bestimmung der Kohlensäure und des Wasserdampfes, dagegen nicht des Sauerstoffes. Kohlensäure und Wasserdampf wurden nicht ihrer Totalität nach, sondern in kleinen Bruchteilen des gesamten, durch das System gehenden Luftvolumens bestimmt. Zu diesem Zwecke benutzte Pettenkofer zwei kleine Saug- und Druckpumpen, die Proben der Exspirationsluft aus der Hauptleitung entnahmen und sich durch eine besondere Übertragung in genau demselben Rhythmus wie die großen Saugzylinder bewegten, die den Durchzug durch das ganze System bewerkstelligten, und folglich immer einen gleichen Bruchteil der gesamten Luftmenge abzweigten. Einen Schritt weiter kamen Sondén und Tigerstedt[1]) damit, daß sie eine Einrichtung schufen, die es möglich machte, einen Versuch in mehrere Teilversuche zu zerlegen, indem sie Gasproben in bestimmten Intervallen entnahmen und dadurch den Gehalt der Kammerluft an Kohlensäure in genau fixierten Momenten ermittelten. Sie verfuhren derart, daß sie an dem Hauptrohre, durch das die ausventilierte Luft strömte, eine Zweigleitung anbrachten, in der durch eine Wasserstrahlluftpumpe eine schwache kontinuierliche Luftströmung unterhalten wurde. Die durch diese Zweigleitung entnommenen Luftvolumina wurden durch eine Gasuhr gemessen und in dem von Johansson[2]) konstruierten Pipettenapparat aufgenommen. Zu einer hohen technischen Vollendung haben Atwater, Rosa und Benedikt[3]) ihren Apparat gebracht. Die Pumpe, welche die Ventilation unterhält, mißt hier gleichzeitig durch den Hub das Volumen der Austrittsluft; die Probeentnahme erfolgt automatisch, indem jeder fünfzigste Pumpenhub das sonst ins Freie beförderte Luftvolumen in ein Sammelgefäß treibt, aus dem es durch eine kleine Pumpe direkt durch die Absorptionsgefäße für Wasser und Kohlensäure gesogen wird. Durch die Einführung einer exakten Sauerstoffbestimmung hat Jaquet[4]) das Pettenkofersche Prinzip wesentlich vervollkommnet. Von dem durch eine Gasuhr gemessenen Ausstrom wird ein aliquoter Teil zur Analyse genommen. Die Teilstromentnahme geschieht durch eine ähnliche Vorrichtung, wie sie Zuntz bei seinem bekannten Apparate verwendet hat. Schließlich hat Grafe[5])

---

[1]) Sondén und Tigerstedt, Untersuchungen über die Respiration und den Gesamtstoffwechsel des Menschen. Skand. Arch. f. Physiol. 6, 1, 1895.

[2]) J. E. Johansson, Über den Einfluß der Temperatur in der Umgebung auf die CO_2-Abgabe des Menschen. Skand. Arch. f. Physiol. 7, 122ff., 1896.

[3]) W. O. Atwater and E. B. Rosa, Description of a new respiration calorimeter. U. S. Depart. of agricult. Off. of exp. Stations. Bul. Nr. 63. Washington 1899.

[4]) A. Jaquet, Ein neuer Apparat zur Untersuchung des respiratorischen Stoffwechsels des Menschen. Vhdlgn. d. naturw. Ges. in Basel 15, 252ff., 1903.

[5]) E. Grafe, Ein Respirationsapparat. Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 1, 1910.

die Jaquetsche Kammer modifiziert; im übrigen hält er sich vollkommen an die Jaquetsche Methode. Von den nach dem Pettenkoferschen Prinzipe gebauten Apparaten für kleinere Tiere ist noch kurz der Apparat von Voit[1]) zu erwähnen, bei dem die Ventilation durch ein oberschlächtiges Wasserrad besorgt wurde. Haldane[2]) bediente sich zu diesem Zwecke einer Wasserstrahlluftpumpe; die produzierte Kohlensäure ermittelte er durch Wägung der Natronkalkgefäße; den Sauerstoffverbrauch versuchte er dadurch zu bestimmen, daß er vor und nach dem Versuche die Respirationskammer mit dem Tiere wog; die jeweilige Differenz von der gesamten Abgabe von Feuchtigkeit und Kohlensäure abgezogen stellte den Sauerstoffverbrauch dar. Der Apparat von Laulanié[3]) brachte außer einer sehr sinnreichen ringförmigen Quecksilberpumpe nichts wesentlich Neues.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß im allgemeinen, wenn man von denjenigen Apparaten absieht, bei deren Benutzung Tracheotomie oder Maske angewandt wurde, für Versuche an kleinen Tieren das Regnault-Reisetsche Prinzip bevorzugt wurde und zur Vervollkommnung anregte. Der Grund hierfür mag wohl darin zu suchen sein, daß das System neben der Bestimmung der Kohlensäure auch die des Sauerstoffs ermöglicht, die beim Pettenkoferschen System entweder für undurchführbar oder doch für zu wenig exakt gehalten wurde. Erst durch Jaquets Einführung der Sauerstoffbestimmung in die Methode gewann das Pettenkofersche System mit konstantem Luftstrom und Teilstromabsaugung einen höheren Wert. In der Erkenntnis, daß keiner der bis dahin bestehenden Apparate die Bedingungen, die man an einen wirklich guten und allseits verwendbaren Respirationsapparat zu stellen berechtigt ist, vollständig erfüllte, ließ sich Jaquet bei der Konstruktion seines neuen Apparates von folgenden Grundsätzen leiten:

1. Man muß mit einem Respirationsapparat Versuche von längerer Dauer anstellen können.

2. Das Versuchsobjekt muß vollständig frei atmen können und darf überhaupt in keiner Weise durch den Versuch belästigt werden.

[1]) C. Voit, Beschreibung eines Apparates zur Untersuchung der gasförmigen Ausscheidungen des Tierkörpers. Zeitschr. f. Biol. **11**, 532ff., 1875.

[2]) J. Haldane, A new form of apparatus for measuring the respiratory exchange of animals. Journ. of Physiol. **13**, 419, 1892.

[3]) F. Laulanié, Sur un appareil pour la mesure des échanges respiratoires. Arch. de Physiol. **1895**, 619ff.

3. Die Untersuchung des Gaswechsels muß sowohl die Kohlensäureproduktion, als den Sauerstoffverbrauch berücksichtigen.

4. Die verschiedenen Phasen eines Versuches müssen verfolgt werden können.

Diese Bedingungen hat Jaquet mit seinem für Versuche am Menschen bestimmten Apparat vollständig erfüllt. Ein Apparat desselben Prinzips für kleinere Tiere, der den Jaquetschen Forderungen gerecht würde, liegt meines Wissens nicht vor.

Für die Lösung unserer Frage bezüglich des Einflusses extremer Außentemperaturen auf den respiratorischen Stoffwechsel war noch ein weiterer Faktor zu berücksichtigen, nämlich die Erzielung und Einhaltung einer bestimmten konstanten Temperatur. Bei den früheren, von anderen Forschern angestellten Versuchen wurde in vielen Fällen einfach so verfahren, daß das Versuchsobjekt in ein Bad von bestimmter Temperatur gebracht, oder bei der jeweiligen Temperatur des Laboratoriums untersucht wurde.

Aus den bereits oben erwähnten Gründen, vor allem um länger dauernde Versuche durchführen zu können, mußten wir von vornherein von solchen Apparaten, bei denen Schnauzenkappen oder Tracheotomie zur Anwendung kamen, Abstand nehmen.

Und da wir ein für allemal eine bestimmte hohe oder niedrige Temperatur erzielen mußten, so war es notwendig, uns durch entsprechende Einrichtungen von der uns umgebenden Temperatur unabhängig zu machen.

Bei Verwendung eines Apparates nach dem Regnault-Reisetschen Prinzip würde die Erzielung und Konstanthaltung einer bestimmten Temperatur keinen besonderen Schwierigkeiten begegnet sein. Wir hätten nur den ganzen Apparat in Wasser von der gewünschten Temperatur bringen und durch entsprechende Kühlung oder Erwärmung für die Erhaltung derselben sorgen müssen. Da wir uns aber die Aufgabe gestellt hatten, einen Apparat zu bauen, der neben der Ermittelung des respiratorischen Stoffwechsels innerhalb einer großen Periode auch die Untersuchung in jedem beliebigen Zeitabschnitt gestattete, und überzeugt waren, daß die Durchführung dieser Forderung bei einem Regnault-Reiset ungleich mehr Manipulationen während des Versuches verlangt, auch zweifellos mehr Fehlerquellen in

sich schließt, so zogen wir das Prinzip des konstanten Luftstroms vor.

Im folgenden sei der komplette Apparat (Tafel IV), so wie er von uns für einen Versuch bei hoher und niedriger Temperatur verwendet wurde, mit allen Details der Kohlensäure- und Sauerstoffbestimmung beschrieben.

Die wesentlichen Teile desselben sind:

1. Der Atmungsrezipient *A*, der das Versuchsobjekt aufnimmt,
2. die Apparatur für die Probeentnahme der Exspirationsluft,
3. das für die Aufnahme der exspirierten Kohlensäure bestimmte Absorptionssystem,
4. das zur Erzielung eines gleichmäßigen Luftstromes dienende Pumpenwerk,
5. die der Vorbehandlung der Luft bezüglich ihrer Zusammensetzung und Temperatur dienenden Einrichtungen.

Das Versuchstier atmet frei, auf einer durchlöcherten Porzellanplatte sitzend in dem Glasrezipienten *A*, der durch einen auf dessen oberen Rand aufgeschliffenen Deckel nach dem Bestreichen mit Vaseline einen luftdichten Abschluß erhält. Der Rezipient trägt zwei seitliche, diametral einander gegenüberstehende Tuben, durch die das den Einstrom bzw. Ausstrom leitende Glasrohr geführt ist. Im Versuche ist derselbe in eine große mit Wasser gefüllte Zinkwanne *B* so tief versenkt, daß er von allen Seiten von dem Wasser umspült wird. Der mit der Exspirationsluft beladene Gasstrom passiert nach seinem Austritt aus dem Rezipienten den zur Absorption der Kohlensäure bestimmten Apparat *C*. Derselbe besteht aus einem System von 10 Waschflaschen, die an ihren unteren Enden offen und verjüngt, mit den seitlichen Ansatzstücken eines horizontal verlaufenden Glasrohres durch kurze Gummischläuche in Verbindung gebracht sind. Dadurch wird eine Kommunikation sämtlicher Waschflaschen erzielt. Nach Bedarf (d. i. beim Durchleiten der Luft während des Versuches) wird diese Verbindung durch Quetschhähne aufgehoben. Das horizontale Glasrohr trägt außerdem ein nach unten gerichtetes, durch einen Hahn verschließbares Ansatzstück zum Entleeren der Flüssigkeit. Die Verbindung der oberen Teile je zweier benachbarter Waschflaschen wird durch ein U-förmig gebogenes Glasrohrstück vermittelt, das durch dickwandige Kautschukschläuche an die Mündung der Ab- bzw. Zuleitungsröhren der Waschflaschen angeschlossen ist. Jede dieser U-Röhren trägt ein nach oben angesetztes Glasrohr mit eingeschliffenem und mit Vaseline abgedichteten Hahn. Der Absorptionsapparat wird zum Versuche mit einem bestimmten Volumen 50%iger Kalilauge gefüllt. Die Füllung erfolgt in der Weise, daß, nachdem der Hahn *D* geschlossen und sämtliche unteren und oberen Hähne geöffnet wurden, die Lauge durch das becherförmig erweiterte Abzugsrohr der letzten Waschflasche sorgfältig eingegossen wird, wobei sich dieselbe sofort gleichmäßig auf sämtliche Waschflaschen verteilt. Nach dem jetzt

erfolgenden Abschluß sämtlicher Hähne wird der Apparat mit seinen freien Enden in den Luftweg eingeschaltet. In ähnlicher Weise wie die Füllung vollzieht sich die Entleerung nach beendetem Versuch. Der Apparat wird zu diesem Zweck aus seinen Verbindungen *E* und *F* losgelöst, die oberen und unteren Hähne werden geöffnet, und die Lauge fließt durch das Ansatzrohr gleichzeitig aus sämtlichen Waschflaschen ab. Durch wiederholtes Nachspülen mit Wasser wird das Absorptionssystem bei möglichster Vermeidung von Luftzutritt vollständig von der Lauge befreit. Der Vorzug des Apparates besteht darin, daß durch ihn die vollständige Absorption der gesamten produzierten Kohlensäure mit relativ geringen Mengen Lauge bei lebhafter Ventilation möglich ist und daß die Füllung und Entleerung desselben sich rasch und leicht vornehmen läßt.

An den Absorptionsapparat schließt sich zur Prüfung auf Vollständigkeit der Absorption eine mit Barytwasser beschickte Waschflasche *G* an. Von hier aus führt der Hauptstrom zur Pumpe bzw. dem Pumpensystem *H*, das den Luftdurchzug durch den ganzen Apparat unterhält. Zum Betriebe der Wasserstrahlluftpumpe verwendeten wir früher die städtische Hochdruckleitung. Für die alleinige Ermittelung der Kohlensäure, die ja in toto von dem Absorptionsapparat aufgenommen wird, spielten Schwankungen der durch den Wechsel des Wasserdruckes bedingten Gasstromgeschwindigkeit keine Rolle. Dagegen mußte für die von uns beabsichtigte Art der Probeentnahme für die Sauerstoffbestimmung ein möglichst konstanter Luftstrom erzielt werden. Nach vielen vergeblichen Bemühungen, eine selbstregulierende Vorrichtung an die städtische Hochdruckleitung anzubringen, um einen konstanten Wasserdruck zu erzielen, legten wir eine besondere Wasserleitung an. Dieselbe wurde durch den vom Souterrain, wo sich das Laboratorium befindet, zum Dach führenden Luftschacht gelegt. Zur Füllung des auf dem Kamin des Daches befestigten Reservoirs, eines ca. 1,2 m hohen und 25 cm weiten Blechzylinders *J*, drückten wir das Wasser aus der Hochdruckleitung durch einen starkwandigen Schlauch *K* in dasselbe. Durch eine zweite mit ihrem einen Schenkel bis zum Boden des Zylinders reichende Leitung *L* floß das nach oben transportierte Wasser nach dem Laboratorium ab, um hier drei miteinander verbundene Wasserstrahlluftpumpen zu speisen. Nur unter Verwendung von drei Pumpen gelang es, bei den im System vorhandenen Widerständen mit einem Wasserdruck von 10 m ein Luftvolumen von ca. 1,5 l pro Minute durch den Apparat zu saugen. Zur Regulierung des Wasserabflusses und der damit zusammenhängenden Ventilation wurde in die Abflußleitung ein Schieberventil *M* eingeschaltet. Der Wasserzufluß wurde nach erfolgter Füllung des Bassins so eingestellt, daß das Flüssigkeitsniveau im Zylinder während der ganzen Versuchsdauer annähernd konstant blieb. Um uns in jedem Momente von dem Stand des Niveaus überzeugen zu können, bedienten wir uns eines elektrischen Signalapparates *N*. Die Funktionsweise dieses Apparates ist ohne weiteres aus der Zeichnung ersichtlich. Hat der Wasserspiegel im Blechzylinder die gewünschte Höhe erreicht, so wird die in dem Gefäße *N*,

dessen einer Schenkel in den Zylinder eintaucht, befindliche verdünnte Schwefelsäure durch Kompression der zwischen den beiden Flüssigkeiten eingeschlossen Luft hoch- und gegen die beiden Kohlenstäbchen gedrückt; dadurch aber wird der Stromkreis einer Batterie *P* geschlossen und die in den Stromkreis gelegte Klingel *O*, die im Laboratorium angebracht ist, tritt in Tätigkeit. Um nicht während des ganzen Versuches durch das Klingeln gestört zu werden, haben wir in die Leitung einen Ausschalter *Q* eingefügt. Da der Wasserzufluß zu dem auf dem Kamine befindlichen Reservoir gleich zu Beginn des Versuches auf die Abflußmenge eingestellt wird, so hat man nur hin und wieder nötig, sich von dem Stand des Niveaus durch Einschalten des Kontaktes zu überzeugen. Außerdem ist durch einen Überlaufheber *R* Sorge getragen, daß ein etwaiger Überschuß von Wasser in dem Zylinder direkt in die Dachrinne abfließt.

Mit der so angelegten Wasserleitung erzielten wir einen gleichmäßigen Durchzug der Luft durch den Apparat.

Zur Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs innerhalb bestimmter Perioden wurde von dem Hauptstrom hinter dem Absorptionsapparate bzw. der Barytwasserflasche ein beliebiges, aber pro Zeiteinheit konstantes Volumen der Austrittsluft zur Analyse entnommen. Diese Art der Probeentnahme weicht von allen bisher beschriebenen Methoden ab; denn ich entnehme, ohne dessen Volumen direkt zu bestimmen, proportionale Mengen des Ausstroms, und ziehe zur Berechnung das gemessene Volumen des Einstroms heran. Die Probeentnahme geschieht mittels des Apparates *S*. Wie aus Fig. 1 ersichtlich, verzweigt sich der Hauptstrom hinter dem Entnahmeapparat. Diese Verzweigung *ST* bezweckt die Herstellung einer Druckverminderung in der z. T. mit 20%iger Kochsalzlösung gefüllten Flasche *T* und damit die Möglichkeit des Eintritts von Kochsalzlösung aus dem Entnahmeapparat *S* durch den Schlauch *U* in diese Flasche. Der Entnahmeapparat besteht aus 2 Büretten, α und β, die auf einem Holzgestell montiert sind und bei einer Einteilung von je 20 ccm ein Fassungsvermögen von je 400 ccm besitzen. Jede der beiden Büretten trägt in ihrem oberen verengten Teile einen T-Hahn, durch den einerseits eine Kommunikation zwischen Bürette und dem Abzugsrohr γ des Ausstroms, andererseits eine solche zwischen Bürette und dem Rohr δ geschaffen werden kann, durch welches das in die Bürette eingesaugte Gas nach dem Sammelgefäß *V* abgeführt wird. Die Büretten tragen außerdem in ihrem unteren verengten Teil je einen Glashahn und vereinigen sich unterhalb desselben in dem Rohrstück ε, das zur Flasche *T* führt. Vor Beginn der Probeentnahme sind die Büretten bis zur Nullpunktsmarke, die über den T-Hähnen angebracht ist, mit Kochsalzlösung gefüllt. Ebenso sind die Flasche *T*, wenigstens einige Zentimeter bis über den Tubus, die beiden Sammelgefäße und die dazu gehörigen Niveaugefäße *V* und V_1, die Druckflasche *W*, sowie sämtliche Verbindungsstücke zwischen den beiden Büretten einerseits, den Büretten und der Flasche *T*, sowie der Druckflasche *W*, den Büretten und den Sammelgefäßen andererseits mit der Salzlösung gefüllt. Bei der Probeentnahme wird abwechselungsweise bald in die eine, bald in die andere

Bürette die zu analysierende Luft eingesaugt und dann in die Sammelgefäße durch die aus der Niveauflasche W abfließende Salzlösung gedrückt. Ich verfahre bei der Entnahme in folgender Weise: Hahn ζ ist seit Beginn des Versuches geöffnet und deshalb steht über der Kochsalzlösung in der Flasche T ein geringes Vakuum; Hahn η und die Hoffmannsche Klemme ϑ sind vorläufig geschlossen.

Soll nun zunächst Luft in die linksstehende Bürette α eingesaugt werden, so wird Hahn α_1 so gestellt, daß Kommunikation zwischen Luftraum γ und Bürette besteht, α_2 wird geöffnet, die beiden Hähne β_1 und β_2 bleiben geschlossen. Im Moment des Beginns der Probeentnahme wird nun die Hoffmannsche Klemme ϑ so weit geöffnet, daß pro Minute ein bestimmtes Volumen der aus dem Apparat ausströmenden Luft durch die in die Flasche T abfließende Salzlösung gesaugt wird. Ich habe die Entnahme stets so geleitet, daß pro Minute 100 ccm Luft an die Stelle der Salzlösung in die Bürette eintraten. Die Einhaltung eines regelmäßigen Einstroms vollzieht sich ohne Schwierigkeit. Während sich nun die linke Bürette mit Luft füllt, wird der Hahn β_2 bereits geöffnet. In dem Momente, wo Bürette α mit Gas gefüllt ist, wird gleichzeitig Hahn α_2 geschlossen und durch Hahn β_1 Kommunikation zwischen Luftraum γ und Bürette β hergestellt, so daß jetzt die Luft in Bürette β einströmt. Während dieser Zeit wird durch Hahn α_1 Verbindung zwischen Bürette α und dem Sammelgefäß V hergestellt und die Luft aus α durch die aus dem Niveaugefäß W abfließende Salzlösung in das Sammelgefäß getrieben, dadurch, daß Quetschhahn $\varkappa$ geöffnet und so lange offen gehalten wird, bis die Flüssigkeit durch den T-Hahn α_1 austritt. Die in das Sammelgefäß eintretende Luft verdrängt durch das Rohr λ die Salzlösung, die in der untergestellten Flasche μ aufgefangen wird. Nun wird Hahn α_1 geschlossen und Hahn α_2 geöffnet. Hat sich schließlich Bürette β mit Luft gefüllt, so wird die Luft wieder in Bürette α eingesaugt und unterdessen das in β befindliche Gas in analoger Weise wie bei α in das Sammelgefäß entleert. Die sämtlichen vorzunehmenden Manipulationen sind so einfach und gehen so rasch vonstatten, daß in der Regel kaum 1 Minute verflossen ist, ehe die Umstellung der Hähne und die Überführung des Gases aus der Bürette in das Sammelgefäß sich vollzogen hat. Die von mir verwendeten Sammelgefäße fassen 3 bis 5 l; die Probeentnahme erstreckte sich in fast allen Fällen über 20 bis 30 Minuten. Man hat es natürlich in der Hand, längere oder kürzere Entnahmen auszuführen und das Volumen der in der Zeiteinheit zu entnehmenden Luftmenge läßt sich nach Belieben variieren. Werden beispielsweise pro Minute nur 50 ccm Luft entnommen, so kann sich bei Verwendung einer 5 l-Flasche als Sammelgefäß die Entnahmezeit auf $1^1/_2$ Stunden erstrecken. Zu Beginn und Ende der Probeentnahme wird der Stand der Gasuhr abgelesen und dadurch das Volumen der in der Zeit der Entnahme durch das System eingetretenen Luft ermittelt.

Die aus dem Niveaugefäß bzw. den Büretten abfließende Salzlösung sammelt sich in der Flasche T an und wird aus dieser durch

eine Wasserstrahlluftpumpe wieder in das Niveaugefäß *W* gepumpt, ohne daß dadurch der Versuch irgendeine wesentliche Störung erfahren würde. Nur kann während dieser Füllung keine Luftprobeentnahme stattfinden. Zum Niveaugefäß führt eine doppelte Glasrohrleitung; durch das eine Rohr, ν, das bis auf den Boden des Gefäßes reicht, fließt die Salzlösung zum Entnahmeapparat ab. Durch eine Abzweigung dieses Rohres ist Verbindung mit der Flasche *X* bewerkstelligt, aus der die Salzlösung zum Niveaugefäß *W* emporgepumpt wird. Die andere Leitung ξ mündet dicht unter der Stopfenbohrung und wird bei der Füllung des Gefäßes mit der Wasserstrahlluftpumpe *o* in Verbindung gebracht, durch die das zum Aufsaugen der Flüssigkeit aus *T* bzw. *X* erforderliche Vakuum erzeugt wird. Zur Füllung des Niveaugefäßes wird zunächst Hahn ζ geschlossen, Hahn η und Hahn π geöffnet, das freie Schlauchstück ϱ am Ende der Rohrleitung mit der Wasserstrahlluftpumpe verbunden, dann angesaugt und jetzt erst Hahn σ geöffnet. Nach erfolgter Füllung werden wieder die früheren Verhältnisse hergestellt.

Die durch das Pumenpsystem aus dem Freien angesaugte Luft passiert zunächst, um von atmosphärischer Kohlensäure befreit zu werden, ein Anzahl Kaliflaschen *Y* und dann eine geeichte Gasuhr *Z*, die das während einer Luftprobenentnahme hindurchgehende Volumen mißt. Der in der Gasuhr herrschende Unterdruck, dessen Größe wir kennen müssen, um die genaue Reduktion des Gasvolumens auf Normalverhältnisse vornehmen zu können, wird durch ein auf der Gasuhr befindliches Chlorcalciummanometer gemessen. Nach der Passage der Gasuhr tritt die Luft in den Rezipienten ein.

Für die von uns auszuführenden Versuche, durch die der Einfluß bestimmter extremer Außentemperatur auf den Gaswechsel studiert werden sollte, war es nötig, Vorrichtungen an dem Apparate anzubringen, die die geforderte Temperaturkonstanz des Gasstromes für unbeschränkte Zeit Gewähr leisteten. Es braucht wohl kaum besonders betont zu werden, daß es bei dem von uns verwendeten Prinzip des konstanten Luftstroms nicht genügt, den Rezipienten einfach in ein mit Wasser gefülltes Bassin von der gewünschten Temperatur zu setzen, um dann in dem Atmungsraume dieselbe Temperatur zu erhalten. Die in den Rezipienten gelangende Luft muß vielmehr schon bei ihrem Eintritt die verlangte Temperatur besitzen. Bei unseren Wärmeversuchen sollte eine Temperatur von 35° zur Anwendung kommen. Wir versuchten die Luft dadurch auf die gewünschte Temperatur zu bringen, daß wir dieselbe durch ein ca. 5 m langes System von spiralförmig gewundenen Glasröhren streichen ließen, die in mit kochendem Wasser gefüllte Gefäße getaucht waren, kamen jedoch bei der erforderlichen Gasstromgeschwindigkeit von ca. 1 l pro Minute über 28° nicht hinaus. Da außerdem die Glasspiralen unter der langen Einwirkung des heißen Wassers litten, so daß sie sehr bald brüchig wurden, griffen wir zu einem anderen Mittel. Dabei stellte sich heraus, daß es der vollen Heizkraft eines Verbrennungsofens *Vb*, wie er zu Elementaranalysen benutzt wird, bedarf, um bei möglichster Raumsparung die Luft bei einer Geschwin-

digkeit von 1 l pro Minute auf 35° zu erwärmen. Da aber die Heizkraft der Gasflammen durch Gasdruckänderungen ständigen Schwankungen unterworfen ist, mußten wir zwischen den Verbrennungsofen und den Respirationsraum eine thermoregulatorische Vorrichtung einschalten. Diese Vorrichtung besteht aus einer leeren 5 l-Flasche *Fl*, die in einen weiten ihre Höhe überragenden und mit Wasser gefüllten Blechzylinder versenkt wird. In diese Flasche tritt die beim Passieren der Verbrennungsröhre vorgewärmte Luft durch einen seitlichen in geringem Abstand von der Bodenfläche befindlichen Tubus ein und verläßt dieselbe durch ein im Stopfen des Flaschenhalses steckendes Glasrohr, um von da in den Rezipienten einzuströmen. Durch eine zweite Bohrung dieses Stopfens führt der Thermoregulator *Th*, der in die zum Verbrennungsofen gehende Gasleitung eingeschaltet ist. Durch eine dritte Bohrung taucht ein Thermometer *Tm* in den Luftraum der Flasche und gestattet so in jedem Augenblicke die Kontrolle der Temperatur. Das mit Wasser gefüllte Blechgefäß, das die Flasche birgt, steht auf einem Dreifuß und wird durch eine kleine Gasflamme erwärmt. Tritt eine geringe Temperaturerhöhung des Luftstromes ein, so steigt das Quecksilber in dem Thermoregulator, verkleinert die Zuströmungsöffnung und verringert dadurch die Gaszufuhr zum Verbrennungsofen: die Temperatur sinkt. Bei fallender Temperatur tritt der umgekehrte Prozeß ein. In gleicher Weise wirkt auch jede zu starke Erwärmung des Thermoregulatorgefäßes durch die unter ihm stehende kleine Gasflamme regulierend auf die Gaszufuhr zum Verbrennungsofen. Diese Einrichtung ermöglichte die Konstanthaltung der Temperatur für unbeschränkte Zeit.

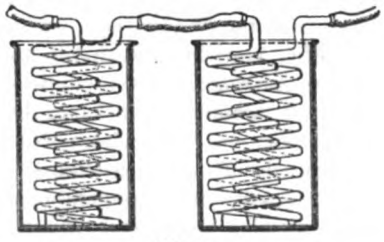


Fig. 1.

Bei den Kälteversuchen genügte es, die Luft durch ein System von Glasspiralen (Fig. 1) zu leiten, die durch ein Kältegemisch gekühlt wurden, um die gewünschte Temperatur von $+5°$ zu erhalten. Ebenso wurde die in dem Blechgefäß stehende Flasche von einem solchen Kältegemisch umgeben; der Thermoregulator fällt natürlich hier weg; dagegen kann auch hier durch das in der Flasche steckende Thermometer die Temperatur des Einstroms kontrolliert werden.

Durch die eben beschriebenen Einrichtungen tritt die Luft mit der gewünschten Temperatur in den Rezipienten ein, und es handelte sich jetzt nur noch darum, dieselbe auch hier konstant zu erhalten. Wir erfüllten diese Forderung, indem wir den Rezipienten in eine große mit

Wasser gefüllte Zinkwanne *B* so tief einsetzten, daß derselbe vollkommen von dem Wasser umspült wurde und indem wir nun das Wasser auf die betreffende Temperatur brachten. Die Heizung des Wannenwassers erfolgte auf elektrischem Wege durch zwei an den Längswänden der Wanne verlaufende Widerstandsspiralen *Ws*, die in Glasröhren eingeschmolzen und an die Gleichstromleitung angeschlossen waren. Durch Beschweren mit Metallstücken wurden die Glasröhren bis auf den Boden des Bassins versenkt. Die Heizkraft dieser Widerstandsspiralen konnte bei einer etwaigen Abweichung der Wassertemperatur von der Norm durch einen in den Stromkreis geschalteten Regulierwiderstand *Rw* jederzeit verändert werden. Für die Durchmischung des auf diese Weise ungleichmäßig erwärmten Wassers sorgte ein Flügelradrührer *Fr*, der durch eine kleine Wasserturbine *Wt* getrieben wurde. Bei den Kälteversuchen wurde das Wannenwasser durch Zusatz von Eis auf die Temperatur von $+5^0$ gebracht und durch zeitweises Nachtragen von Eis auf derselben erhalten. Ein in das Wannenwasser schwimmend eingesetztes Thermometer zeigt die Temperatur desselben an.

Nach der bis jetzt beschriebenen Anordnung der gesamten Apparatur wird die von dem Tiere während eines Versuches ausgeschiedene Kohlensäure in dem Absorptionsapparate zurückgehalten und ihrer Quantität nach in der Lauge bestimmt. Von der nun von Kohlensäure befreiten Luft wird zu bestimmten Zeiten eine Probe entnommen und auf ihre Zusammensetzung analysiert. Die Dauer der Probeentnahmen sowie die Geschwindigkeit derselben ist dem Ermessen des Experimentators anheimgestellt. Für den Fall, daß zwei Probeentnahmen sehr rasch nacheinander ausgeführt werden sollen, habe ich das von dem Entnahmeapparat zu dem Sammelgefäß führende Rohr *Vg* gegabelt und an jedes Gabelstück eine Sammelflasche angeschlossen. Nach ihrer Füllung mit Luft werden die Sammelflaschen entfernt und durch neue ersetzt. Ich verfuhr bei meinen Probeentnahmen in der Regel derart, daß ich bei einer Geschwindigkeit des Zweigstromes von 100 ccm pro Minute innerhalb 1 Stunde 20 Minuten lang entnahm. Da die Geschwindigkeit des Hauptstromes durch das System im Durchschnitt pro Minute 1 l betrug, das Volumen der entnommenen Luft 100 ccm, so kommt ungefähr der 10. Teil des gesamten während der Entnahmezeit aus dem Rezipienten strömenden Luft zur Analyse. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß bei diesem geringen Verhältnis zwischen Haupt- und Zweigstrom ein sehr guter Durchschnittswert auch dann erzielt werden muß, wenn das den Rezipienten verlassende Gasgemisch noch nicht vollkommen einheitlich gemischt sein sollte. Im Augenblicke des Beginnes und Endes der Entnahme wird der Stand der Gasuhr abgelesen und dadurch das während der Entnahmezeit in den Rezipienten einströmende Volumen der atmosphärischen von Kohlensäure befreiten, feuchten Luft ermittelt. Nach den Untersuchungen von Hempel und Kreußler[1]) kann das Verhältnis zwischen Sauerstoff und Stickstoff in der At-

[1]) Hempel und Kreußler, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 20, 1864.

mosphäre als konstant betrachtet werden. Deshalb wurde die Analyse des Einstroms unterlassen und der Berechnung die von Hempel-Kreußler ermittelten Werte von 20,93% für Sauerstoff und 79,07% für Stickstoff zugrunde gelegt.

Da wir mit Meerschweinchen operierten, die durch eine 24stündige Hungerperiode zum Versuche vorbereitet waren, konnten wir uns damit begnügen, die Austrittsluft auf ihr prozentuales Verhältnis zwischen Sauerstoff und Stickstoff zu untersuchen; denn nach den Untersuchungen von Colasanti[1]) steht fest, daß Meerschweinchen im Hungerzustande keine brennbaren Gase abgeben. Und da ferner nach Colasanti[2]) und auch Oppenheimer[2]) Stickstoff von den Tieren nicht exhaliert wird, so ist der Sauerstoffverbrauch des Tieres für die Entnahmezeit leicht aus den entsprechenden Daten zu berechnen. Die Berechnung desselben erfolgt auf indirektem Wege über das für Ein- und Ausstrom gleiche Stickstoffvolumen.

Der Apparat bietet, wie wir gesehen haben, die Möglichkeit, während eines länger dauernden Versuches beliebig viele Proben zu entnehmen. Wir sind dadurch in die Lage versetzt, die verschiedenen Phasen eines Versuches hinsichtlich des Sauerstoffverbrauches zu verfolgen. Für die Kohlensäure ist dies nach der bis jetzt beschriebenen Anordnung nicht möglich. Um aber diesen Vorzug auch für die Kohlensäure zu schaffen, schaltete ich einen zweiten Absorptionsapparat parallel zu dem ersten, indem ich das die Luft aus dem Rezipienten abführende Rohr gabelte und an die beiden Gabelstücke die Absorptionsapparate anschloß; hinter den Absorptionsapparaten wurden die beiden Parallelströme wiederum vereinigt. Beide Absorptionsapparate sind einzeln in sich abschließbar und können während des Versuches entleert und wieder gefüllt werden. Somit kann jetzt auch die Kohlensäureproduktion während eines längeren Versuches in beliebig viele Perioden zerlegt werden.

Von dem aus dem Rezipienten kommenden Leitungsrohr zweigt sich bei *Zl* weiterhin ein Glasrohr nach oben ab, das sich jenseits der Barytwasserflasche wieder mit der Hauptleitung vereinigt. Es ist durch die Hähne *Zh* und *Zi* ebenfalls in sich abschließbar und stellt einen dritten Weg für den Luftstrom dar. Diesen Weg lassen wir die Luft vor Beginn des eigentlichen Versuches zurücklegen. Er kann aber auch einem weiteren Zwecke dienen: Lassen wir nämlich den Luftstrom nach dem Austritt aus dem Rezipienten, statt ihn durch einen der Absorptionsapparate zu führen, dieses Rohr passieren, so bleibt in diesem Falle die Kohlensäure in der Austrittsluft und wird mit dem Sauerstoff und Stickstoff zusammen gasanalytisch ermittelt. Diese Einrichtung ist für Versuche von kürzerer Dauer oder solche mit rasch verlaufenden Vari-

---

[1]) Colasanti, Über den Einfluß der umgebenden Temperatur auf den Stoffwechsel der Warmblüter. Arch. f. d. ges. Physiol. **14**, 122, 1877.

[2]) C. Oppenheimer l. c.

ationen im Stoffwechsel gedacht. Fig. 2 zeigt den Querschnitt der Anordnung zwischen *Zl* und *Zi* der Tafel IV.

Mit dem vorliegenden Apparate glaube ich den Ansprüchen, die an einen modernen Respirationsapparat zu stellen sind, gerecht geworden zu sein. Die Handhabung desselben ist einfach und erfordert keine besondere Übung. Die Bestimmung der Kohlensäureproduktion muß als einwandfrei bezeichnet werden, da die Absorption vollständig ist und die Analyse der Kohlensäure in der Lauge nach der Methode von Fresenius-Classen

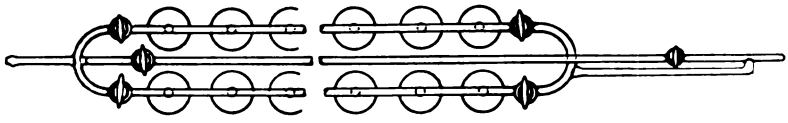


Fig. 2.

theoretische Werte liefert. Die Güte des Sauerstoffresultats hängt von der Exaktheit ab, mit der die Gasanalyse ausgeführt wird; denn das prozentuale Verhältnis zwischen Sauerstoff und Stickstoff im Ein- und Ausstrom differiert nicht allzusehr, und die geringsten Fehler bei der Analyse bedingen schon beträchtliche Abweichungen.

Zum Schlusse bringe ich noch das Protokoll eines 5stündigen Meerschweinchenversuches, bei dem die Kohlensäure der ersten Stunde gesondert in dem einen, die von der zweiten bis fünften Stunde produzierte Menge in dem zweiten Absorptionsapparate in toto aufgefangen wurde. Zur Ermittelung des verbrauchten Sauerstoffs wurden vier Proben der Austrittsluft von je 20 Minuten Dauer, und zwar in der ersten, zweiten, dritten und fünften Stunde entnommen.

Versuchsprotokoll.

Meerschweinchen 299.

Versuch vom 22. Juli 1912.

Versuchstemperatur $+5^0$.
Mittleres Gewicht des Tieres: 396 g.
Oberfläche des Tieres: 544 qcm.
Körpertemperatur vor dem Versuch = $37{,}5^0$
„ nach „ „ = $37{,}6^0$.
Nachdem das Tier 24 Stunden gehungert hatte, begann
der Versuch morgens 9^{37}
und endete nachmittags 2^{37};
dauerte mithin 5 Stunden.

Kohlensäurebilanz.

Die in der 1. Stunde produzierte Kohlensäure wurde gesondert in dem einen, die in den weiteren 4 Stunden produzierte Kohlensäure in einem 2. Absorptionsapparate aufgenommen.

1. Stunde.

Anfangslauge (200 ccm) . . . . . = 0,5980 g CO_2
Endlauge (300 ccm) . . . . . = 1,5120 g CO_2
In der 1. Stunde produziert . . . = 0,9140 g CO_2 = 466 ccm
Pro 1. Stunde und 100 g . . . . = 118 ccm
„ Stunde und qdm . . . . . = 86 „

2. bis 5. Stunde.

Anfangslauge (300 ccm) . . . . . = 0,8970 g CO_2
Endlauge (1000 ccm) . . . . . = 4,6530 g CO_2
Von der 2. bis 5. Stunde . . . . = 3,7560 g CO_2 = 1,917 l
Pro Stunde und 100 g . . . . . = 121 ccm
„ „ „ qdm . . . . . = 88 „

Sauerstoffbilanz.

1. Luftprobeentnahme (Mitte der 1. Stunde).

Beginn der Entnahme . . . . . = 9^{57}
Ende „ „ . . . . . = 10^{17}
Dauer „ „ . . . . . = 20 Minuten.
Mittlerer Barometerstand (korr.) . . . . . = 757,9 mm Hg
Manometer der Gasuhr . . . . . = — 15,1 mm Hg
Mittlere Temperatur des Gasstromes . . . = 20,2°
Durch die Gasuhr strömten in 20 Minuten = 17,343 l Luft.

	Einstrom.		Ausstrom.	
	Prozentual	Absolut	Prozentual	Absolut
Sauerstoff . .	20,93	3,630 l	19,80	3,386 l
Stickstoff . .	79,07	13,713 l	80,20	13,713 l
	100,00	17,343 l	100,00	17,099 l

Verbr. Sauerstoff (0°, 760 mm u. Trockenheit) in 20 Min. . . = 216 ccm
„ „ (0°, 760 „ „ „) pro Std. . . . = 649 „
„ „ (0°, 760 „ „ „) pro Std. u. 100 g = 164 „
„ „ (0°, 760 „ „ „) „ „ „ qdm = 119 „
Respirator. Quotient (berechnet aus Sauerstoff u. CO_2 der 1. Std.) = 0,718.

Sauerstoffbilanz.

2. Luftprobeentnahme (Mitte der 2. Stunde).

Beginn der Entnahme . . . . . = 10^{57}
Ende „ „ . . . . . = 11^{17}
Dauer „ „ . . . . . = 20 Minuten.
Mittlerer Barometerstand (korr.) . . . . . = 757,9 mm Hg
Manometer der Gasuhr . . . . . = — 15,1 mm Hg
Mittlere Temperatur des Gasstromes . . . = 20,0°
Durch die Gasuhr strömten in 20 Minuten = 17,304 l Luft.

	Einstrom.		Ausstrom.	
	Prozentual	Absolut	Prozentual	Absolut
Sauerstoff . .	20,93	3,622 l	19,80	3,378 l
Stickstoff . .	79,07	13,682 l	80,20	13,682 l
	100,00	17,304 l	100,00	17,060 l

Verbr. Sauerstoff (0°, 760 mm u. Trockenheit) in 20 Min. . . = 217 ccm
„ „ (0°, 760 „ „ „) pro Std. . . . = 651 „
„ „ (0°, 760 „ „ „) pro Std. u. 100 g = 164 „
„ „ (0°, 760 „ „ „) „ „ „ qdm = 120 „

Respirator. Quotient (berechnet aus Sauerstoff der 2. Stunde und CO_2 der 2. bis 5. Stunde) . . . . . = 0,736.

Sauerstoffbilanz.

3. Luftprobeentnahme (Mitte der 3. Stunde).
Beginn der Entnahme . . . . . = 11^{57}
Ende „ „ . . . . . = 12^{17}
Dauer „ „ . . . . . = 20 Minuten.
Mittlerer Barometerstand (korr.) . . . . . = 757,3 mm Hg
Manometer der Gasuhr . . . . . = — 15,1 mm Hg
Mittlere Temperatur des Gasstromes . . . = 19,8°
Durch die Gasuhr strömten in 20 Minuten = 17,343 l Luft.

	Einstrom.		Ausstrom.	
	Prozentual	Absolut	Prozentual	Absolut
Sauerstoff . .	20,93	3,630 l	19,81	3,388 l
Stickstoff . .	79,07	13,713 l	80,19	13,713 l
	100,00	17,343 l	100,00	17,101 l

Verbr. Sauerstoff (0°, 760 mm u. Trockenheit) in 20 Min. . . = 215 ccm
„ „ (0°, 760 „ „ „) pro Std. . . . = 646 „
„ „ (0°, 760 „ „ „) pro Std. u. 100 g = 163 „
„ „ (0°, 760 „ „ „) „ „ „ qdm = 119 „

Respirator. Quotient (berechnet aus Sauerstoff der 3. Stunde und CO_2 der 2. bis 5. Stunde) . . . . . = 0,742.

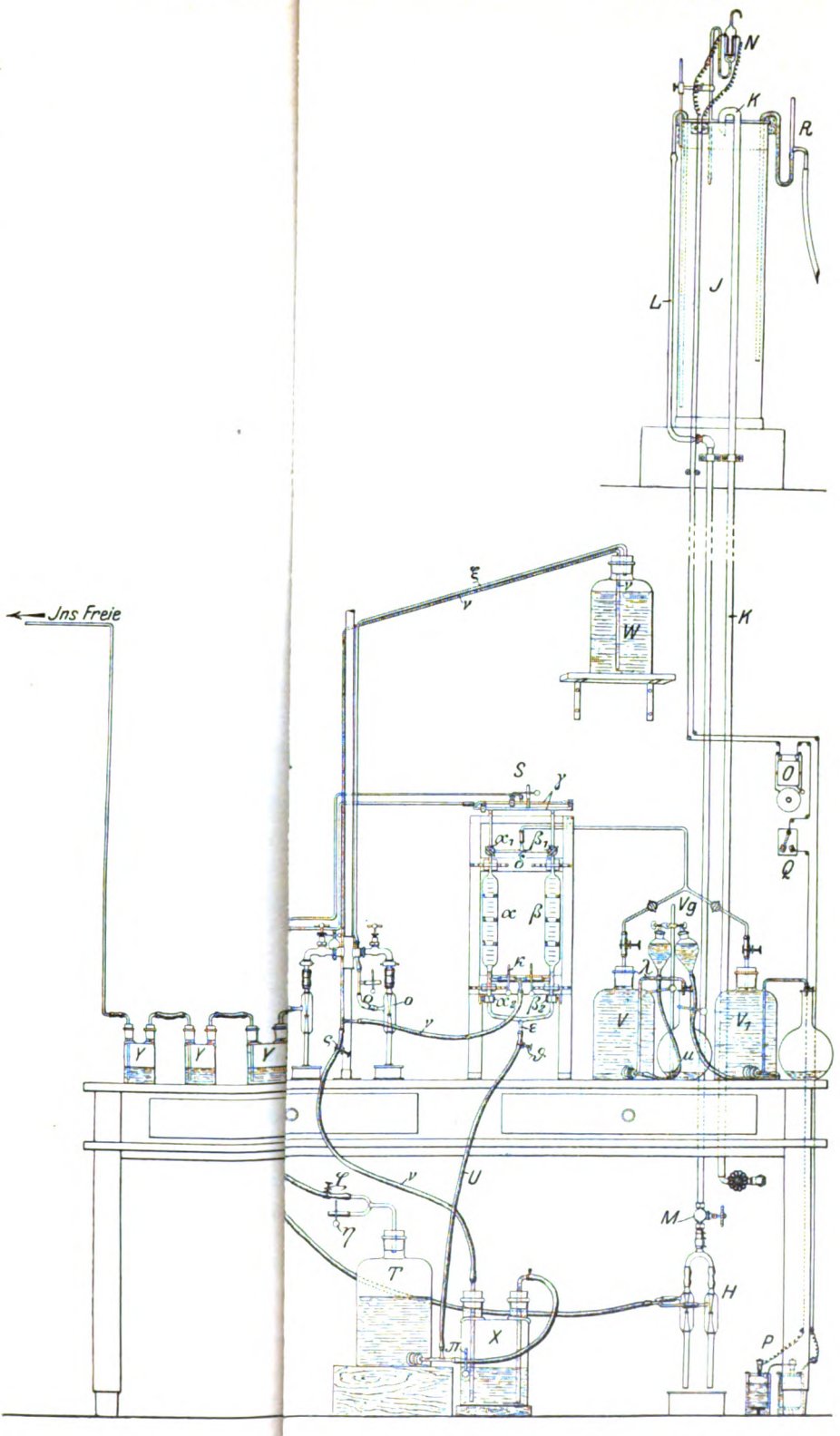
Sauerstoffbilanz.

4. Luftprobeentnahme (Mitte der 5. Stunde).
Beginn der Entnahme . . . . . = 1^{57}
Ende „ „ . . . . . = 2^{17}
Dauer „ „ . . . . . = 20 Minuten.
Mittlerer Barometerstand (korr.) . . . . . = 756,0 mm Hg
Manometer der Gasuhr . . . . . = — 15,1 mm Hg
Mittlere Temperatur des Gasstromes . . . = 19,1°
Durch die Gasuhr strömten in 20 Minuten = 14,991 l Luft.

	Einstrom.		Ausstrom.	
	Prozentual	Absolut	Prozentual	Absolut
Sauerstoff . .	20,93	3,138 l	19,67	2,902 l
Stickstoff . .	79,07	11,853 l	80,33	11,853 l
	100,00	14,991 l	100,00	14,755 l

Verbr. Sauerstoff (0°, 760 mm u. Trockenheit) in 20 Min. . . = 210 ccm
„ „ (0°, 760 „ „ „) pro Std. . . . = 631 „
„ „ (0°, 760 „ „ „) pro Std. u. 100 g = 159 „
„ „ (0°, 760 „ „ „) „ „ „ qdm = 116 „
Respirator. Quotient (berechnet aus Sauerstoff der 5. Stunde und CO_2 der 2. bis 5. Stunde) . . . . . = 0,759.

Tafel IV.



Über die Bildung von flüchtigen Säuren durch Hefe bei Umgärungen von Weinen.

Von

C. von der Heide und E. Schwenk.

(Mitteilung aus der önochem. Versuchsstation Geisenheim a. Rh.)

(Eingegangen am 17. Mai 1912.)

Daß die Hefe flüchtige Säuren erzeugt, ist bekannt[1]). So dürften die in jedem normalen Weine vorkommenden geringen Mengen flüchtiger Säure von 0,01 bis 0,04 g (in 100 ccm) auf die Tätigkeit der Hefe zurückzuführen sein. Gärt man Weine um, d. h. versetzt man säurereiche, aber alkoholarme Naturweine mit Zuckerlösungen und unterwirft sie einer nochmaligen Gärung, so steigt auch der flüchtige Säuregehalt. Versteht man die Umgärung richtig zu leiten, so beträgt die Zunahme an flüchtiger Säure meist nur 0,02 bis 0,04 g. Ganz anders aber gestaltet sich die Sachlage, wenn bei der abermaligen Einleitung der Gärung technische Fehler begangen werden. Dann erreicht der Gehalt an flüchtiger Säure leicht eine Höhe von 0,09 bis 0,12 g, ja unter Umständen wird der Wein vollständig stichig. So ist es eine bekannte Tatsache, daß in früheren Zeiten, als die Verwendung der Reinhefe in technischen Betrieben noch unbekannt war, bei der Umgärung nicht unbedeutende Weinmengen infolge Stichigwerdens verloren gingen. Ja sogar heute werden manchmal noch technische Fehler bei der Umgärung begangen, deren gewöhnlichste Folge ebenfalls ein unerwünschtes Ansteigen des flüchtigen Säuregehaltes ist.

Vielfache praktische Erfahrungen zeigten mir, daß besonders immer dann die Weine in Gefahr geraten, stichig zu werden,

[1]) Vgl. das Sammelreferat von K. Kroemer, Weinbau und Weinhandel. **30**, 99 bis 100, 109 bis 110 (1912).

wenn die Hefeaussaat zu gering gewählt worden ist. Es erschien mir daher nicht unmöglich, daß der Hefevermehrung in gezuckerten Weinen, die doch immerhin einige Prozente Alkohol besitzen, eben wegen dieser ungünstigen Lebensbedingungen gewisse Schwierigkeiten erwachsen, die sich in einer vermehrten flüchtigen Säureerzeugung kundgeben.

Wir suchten durch die vorliegende Arbeit festzustellen, ob tatsächlich durch verschieden große Hefezusätze bei der Umgärung die Menge der gebildeten flüchtigen Säure beeinflußt werden kann.

Gleichzeitig prüften wir, ob es auch von einem verschieden hoch bemessenen Anfangsgehalt des Gärgutes an Alkohol oder von einem verschieden großen Zuckerzusatz zum Gärgut abhängig sei, wieviel flüchtige Säure die Hefe zu erzeugen vermag. Wir gingen dabei in folgender Weise vor:

Ein Traubenwein wurde im luftverdünnten Raum auf ein Zehntel seines Maßes eingedampft, so daß er von seinem Gehalt an Alkohol vollständig und an flüchtiger Säure größtenteils befreit wurde. Durch Wasserzusatz wurde der Eindampfrückstand wieder auf das ursprüngliche Maß gebracht.

Gleichzeitig wurde soviel reiner Alkohol zugesetzt, daß die Flüssigkeit gerade 3 g Alkohol enthielt. (Außerdem wurde die flüchtige Säure in zwei Versuchen zu 0,010 g ermittelt.)

Mit diesem Weine wurden drei Versuchsreihen, jede aus zwölf Einzelversuchen bestehend, durchgeführt.

Die drei Reihen unterschieden sich dadurch voneinander, daß den Versuchen der ersten Reihe wenig, denen der zweiten mäßig viel, denen der dritten sehr viel Hefe[1]) zugesetzt wurde.

Es enthielt nämlich 1 l Gärgut

der	1.	Reihe	0,672	Mill.	Hefezellen	(18	Zählungen),
„	2.	„	25,12	„	„	(25	„),
„	3.	„	489600	„	„	(25	„).

Die 12 Versuche jeder Reihe gliedern sich in 4 Gruppen zu je 3 Versuchen.

[1]) Zur Umgärung wurde die Moselweinhefe „Winningen" der Geisenheimer Hefereinzuchtstation verwandt, die sich durch besonders vorteilhafte Eigenschaften, wie gutes Absetzen, starkes Gärvermögen usf. auszeichnet. Die nötige Hefemenge wurde in sterilisiertem Traubenmost herangezüchtet.

Das Gärgut der 1. Gruppe enthielt 3 g Alkohol, das der 2. Gruppe 4 g, das der 3. Gruppe 5 g und das der 4. Gruppe 6 g. Deshalb mußte, da das ursprüngliche Gärgut nur mehr 3 g Alkohol enthielt, für die Versuche der 2., 3. und 4. Gruppe dem Weine Alkohol in berechneter Menge zugesetzt werden.

Die Menge des Zuckerzusatzes wurde so gewählt, daß der Alkoholgehalt des Weines nach vollzogener Umgärung bei dem 1. Versuche der 4 Gruppen zwischen 6 und 7 g, bei dem 2. Versuche jede der 4 Gruppen zwischen 8 und 9 g und bei dem 3. Versuche jede der 4 Gruppen zwischen 10 und 11 g betragen sollte. Der Zucker wurde in Form einer wässerigen, etwa 50%-igen Lösung zugesetzt.

Schließlich wurde festgestellt, wieviel Kubikzentimeter Flüssigkeit (Alkohol und Zuckerlösung) im Höchstfalle einem Versuche zugesetzt worden war. Allen anderen Versuchen, die dieses Höchstmaß an Zusatz nicht erhalten hatten, wurde der Unterschied zwischen diesem Höchstmaß und ihrem wirklich erhaltenen Zusatz in Form von sterilem, reinem Wasser zugesetzt. Hierdurch wurde erreicht, daß alle 36 Versuche sich anfangs nur in bezug auf ihren Alkohol- und Zuckergehalt unterschieden, daß aber alle anderen Stoffe sich in fast derselben Verdünnung vorfanden.

Alle nötigen Lösungen waren vor dem Hefezusatz sterilisiert worden. Nach Möglichkeit wurde auch später für steriles Arbeiten Sorge getragen. Die Gärflaschen waren alle von gleichmäßiger Form; verschlossen wurden sie mit einem Schwefelsäuregärverschluß. Die Temperatur während der Gärung schwankte zwischen 20 und 25°.

Als die Hefe sich nach beendigter Hauptgärung abzusetzen begann, wurde sie anfangs täglich, später alle drei Tage durch kräftiges Schütteln der Flaschen wieder aufgerührt. Nach 10 Wochen Gärdauer wurden die vollständig klaren Weine von der Hefe getrennt. Die Hefen wurden makroskopisch und mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft. Es ließ sich bei keiner der 36 Hefeproben eine Beimischung fremder Organismen feststellen; insbesondere waren keine Essigsäurebakterien, Kahmhefen oder Schimmelpilze nachzuweisen.

Die vollständig klaren Weine wurden analysiert, die dabei erhaltenen Zahlenwerte sind in den folgenden drei Tafeln niedergelegt.

1. Reihe.

1 l des Gärgutes enthält 672 000 Hefezellen (18 Zählungen).

Nr. des Versuchs	1	2	3	4	5	6	7	8
	Alkohol	Flüchtige Säure		Spezifisches Gewicht des			Extrakt	Zucker
				Weines	alkohol. Destillats	entgeisteten Rückstands (berechnet)		
	g	ccm-N.	g				g	g
	1. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 3 g.							
1	6,34	0,53	0,032	0,9979	0,9890	1,0089	2,30	0,086
2	8,49	0,65	0,039	0,9648	0,9858	1,0091	2,35	0,089
3	10,44	0,85	0,051	0,9944	0,9831	1,0113	2,92	0,376
	2. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 4 g.							
4	6,34	0,50	0,030	0,9978	0,9890	1,0088	2,27	0,085
5	8,56	0,53	0,035	0,9946	0,9857	1,0089	2,30	0,090
6	10,52	0,87	0,052	0,9938	0,9830	1,0108	2,79	0,365
	3. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 5 g.							
7	6,79	0,41	0,024	0,9969	0,9883	1,0086	2,22	0,084
8	8,49	0,56	0,034	0,9941	0,9858	1,0082	2,12	0,086
9	10,81	0,80	0,048	0,9924	0,9826	1,0098	2,53	0,184
	4. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 6 g.							
10	6,99	0,43	0,026	0,9961	0,9880	1,0082	2,12	0,076
11	8,84	0,51	0,031	0,9938	0,9853	1,0085	2,19	0,084
12	10,96	0,67	0,040	0,9925	0,9824	1,0100	2,58	0,322

2. Reihe.

1 l des Gärgutes enthält 25120000 Zellen (25 Zählungen).

Nr. des Versuchs	1	2	3	4	5	6	7	8
	Alkohol	Flüchtige Säure		Spezifisches Gewicht des			Extrakt	Zucker
				Weines	alkohol. Destillats	entgeisteten Rückstands (berechnet)		
	g	ccm-N.	g				g	g
	1. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 3 g.							
13	6,21	0,59	0,035	0,9982	0,9892	1,0089	2,30	0,093
14	8,42	0,70	0,042	0,9954	0,9859	1,0095	2,45	0,092
15	10,14	0,93	0,054	0,9944	0,9835	1,0110	2,84	0,314
	2. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 4 g.							
16	6,73	0,53	0,032	0,9976	0,9884	1,0091	2,35	0,089
17	8,63	0,65	0,039	0,9953	0,9856	1,0097	2,50	0,097
18	10,59	0,91	0,055	0,9935	0,9829	1,0106	2,74	0,290
	3. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 5 g.							
19	6,73	0,53	0,032	0,9970	0,9884	1,0086	2,22	0,080
20	8,70	0,63	0,038	0,9941	0,9855	1,0087	2,25	0,086
21	10,81	0,75	0,045	0,9921	0,9826	1,0095	2,45	0,124
	4. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 6 g.							
22	6,99	0,45	0,027	0,9962	0,9880	1,0083	2,14	0,082
23	8,77	0,51	0,031	0,9941	0,9854	1,0087	2,25	0,089
24	10,82	0,67	0,040	0,9919	0,9826	1,0093	2,40	0,115

3. Reihe.
1 l des Gärgutes enthält 489600000000 Hefezellen (20 Zählungen).

Nr. des Versuchs	1	2	3	4	5	6	7	8
	Alkohol	Flüchtige Säure		Spezifisches Gewicht des			Extrakt	Zucker
				Weines	alkohol. Destillats	entgeisteten Rückstands (berechnet)		
	g	ccm-N.	g				g	g
	1. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 3 g.							
25	6,34	0,53	0,032	0,9985	0,9890	1,0096	2,48	0,088
26	8,28	0,72	0,043	0,9958	0,9860	1,0098	2,53	0,094
26	10,59	0,93	0,056	0,9930	0,9820	1,0101	2,61	0,113
	2. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 4 g.							
28	6,59	0,52	0,031	0,9979	0,9886	1,0093	2,40	0,089
29	8,70	0,63	0,038	0,9954	0,9855	1,0099	2,56	0,094
30	10,74	0,90	0,054	0,9923	0,9827	1,0095	2,45	0,109
	3. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 5 g.							
31	6,93	0,49	0,029	0,9976	0,9881	1,0095	2,45	0,088
32	8,56	0,63	0,038	0,9944	0,9857	1,0087	2,25	0,092
33	10,81	0,78	0,047	0,9923	0,9826	1,0097	2,50	0,107
	4. Gruppe: Alkoholgehalt des Gärgutes etwa 6 g.							
34	6,53	0,49	0,029	0,9968	0,9887	1,0081	2,09	0,099
35	9,42	0,58	0,035	0,9939	0,9845	1,0093	2,40	0,092
36	10,96	0,73	0,044	0,9919	0,9824	1,0095	2,45	0,100

Die Versuche zeigen — entgegen unserer anfangs gehegten Vermutung —, daß die flüchtige Säuremenge, die bei der Umgärung gebildet wird, von der Anzahl der im Gärgut ausgesäten Hefezellen durchaus unabhängig ist. Obwohl nämlich in der 1. Versuchsreihe 700000 mal weniger Zellen in der Maßeinheit vorhanden waren als in der 3. Versuchsreihe, sind doch die gebildeten Säuremengen in allen korrespondierenden Versuchen fast gleich groß. Es entsprechen sich z. B. Versuch 1, 13 und 25 mit 0,032, 0,035 und 0,032 g flüchtiger Säure oder Versuch 2, 14 und 26 mit 0,039, 0,042 und 0,043 g flüchtiger Säure[1]) usf.

Ferner konnten wir zeigen, daß auch der Anfangsgehalt des Gärgutes an Alkohol[2]) auf die Menge der gebildeten flüch-

[1]) Da man nach dem amtlichen Verfahren die flüchtige Säure unter keinen Umständen genauer als auf einige Milligramm bestimmen kann, liegen die beobachteten Abweichungen innerhalb der zulässigen Fehlergrenze. Bei steigendem Gehalt an flüchtiger Säure werden die analytischen Fehler übrigens bedeutend größer.

[2]) Wenigstens nicht in dem geprüften, für die Umgärung in der Praxis wichtigen Gebiete von 3 bis 6 g.

tigen Säure keinen nennenswerten Einfluß hat. Vergleichen wir z. B. die 4 Gruppen der 1. Versuchsreihe, so finden wir folgende Werte für flüchtige Säure:

Anfangsgehalt an Alkohol							
3 g		4 g		5 g		6 g	
Versuch	Flüchtige Säure g	Versuch	Flüchtige Säure g	Versuch	Flüchtige Säure g	Versuch	Flüchtige Säure g
1	0,032	4	0,030	7	0,024	10	0,026
2	0,039	5	0,035	8	0,034	11	0,031
3	0,051	6	0,052	9	0,048	12	0,040

Würde ein steigender anfänglicher Alkoholgehalt die flüchtige Säureerzeugung ebenfalls steigern, so müßte in den Versuchen 1, 4, 7, 10 (oder 2, 5, 8, 11 oder 3, 6, 9, 12) die flüchtige Säure zunehmen. Dies ist aber nicht der Fall, er scheint im Gegenteil eher abzunehmen. Daß diese Abnahme der flüchtigen Säure jedoch auf eine andere Ursache zurückzuführen ist, soll gleich gezeigt werden.

Vergleicht man nämlich die neugebildeten Mengen Alkohol mit den neugebildeten Mengen flüchtiger Säure, so erhält man folgendes Bild:

In den Versuchen			beträgt die Neubildung von Alkohol g			flüchtiger Säure[1]) g		
10	22	19	1,0	1,0	1,7	0,016	0,017	0,022
16	20	11	2,7	2,7	2,8	0,022	0,028	0,021
13	1	20	3,2	3,3	3,7	0,025	0,022	0,028
17	29	24	4,6	4,7	4,8	0,029	0,028	0,030
12	14	21	5,0	5,4	5,8	0,030	0,032	0,035
6	18	30	6,5	6,6	6,7	0,042	0,045	0,044
16	3	27	7,1	7,4	7,6	0,044	0,041	0,046

Diese Werte zeigen, daß in dem Maße, als Alkohol neu gebildet wird, auch die flüchtige Säure zunimmt. Jedoch ist diese Zunahme des Säuregehaltes der Alkoholvermehrung nicht proportional. Wir möchten sogar davor warnen, eine zahlenmäßige Beziehung zwischen Alkohol- und flüchtiger Säurebildung aufzustellen, die doch nur für ganz bestimmte Zusammen-

[1]) Es muß berücksichtigt werden, daß der Gehalt des Gärgutes an flüchtiger Säure 0,010 g beträgt.

setzungen des Gärgutes Geltung haben könnten; denn wieviel flüchtige Säure die Hefe erzeugt, hängt zweifellos außer von der Menge des gebildeten Alkohols noch von anderen Umständen ab[1]).

So hat z. B. der Bruder[2]) des einen von uns auf Anregung von K. Kroemer nachgewiesen, daß die Erzeugung von flüchtigen Säuren ganz außerordentlich von der ursprünglichen Zuckerkonzentration des Gärgutes beeinflußt wird. Der eine von uns (C. von der Heide) hat in Gemeinschaft mit K. Kroemer diese Versuche in erweitertem Maße und auch noch andere Gesichtspunkte berücksichtigend wieder aufgenommen, so daß wir bald darüber berichten zu können hoffen.

Nachdem wir also gezeigt haben, daß es bei Umgärungen von Weinen mit reingezüchteten Hefen theoretisch gleichgültig ist, ob die Hefeaussaat groß oder klein bemessen wird, bleibt noch der Widerspruch dieser Ergebnisse mit den obenerwähnten Erfahrungen der Praxis aufzuhellen, nach denen mit zu wenig Hefe umgegorene Weine häufig stichig werden.

Wir glauben uns diesen Unterschied so erklären zu sollen:

Während wir unsere Versuche mit sterilem Gärgut angestellt haben, arbeitet die Praxis stets mit Weinen, die eine mehr oder weniger reichhaltige Bakterienflora aufweisen. Dabei sind besonders solche Bakterienarten vertreten, die in bekannter Weise Zucker in Milchsäure zerlegen und dabei als Nebenprodukte flüchtige Säure bilden[3]).

Wenn nun in einem nochmals mit Zucker versetzten Weine infolge reichlicher Hefeaussaat der Zucker rasch vergoren wird, so ist den Bakterien jede Möglichkeit genommen, ihre verderbliche Tätigkeit zu entfalten.

Bei kärglicher Hefeaussaat hingegen dauert es sehr lange, bis die Alkoholbildung lebhaft einsetzt. Bis zu diesem Zeitpunkt ist aber den Bakterien die günstigste Gelegenheit geboten, sich in dem stark zuckerhaltigen, aber alkoholarmen Gärgut zu vermehren und jene unerwünschten Stoffe zu erzeugen.

---

[1]) Vgl. das Sammelreferat von K. Kroemer, Weinbau und Weinhandel. **30**, 99 u. 109 (1912).

[2]) R. von der Heide, Bericht der Kgl. Lehranstalt Geisenheim 1907, S. 254.

[3]) K. Kroemer, Weinbau und Weinhandel. **30**, 110 (1912).

Dabei sei noch auf folgenden Umstand hingewiesen: Unsere Versuche lassen zwar keinen Einfluß der Hefemenge auf die Menge der gebildeten flüchtigen Säure erkennen, dagegen bleibt mit steigendem Endgehalt an Alkohol bei geringerer Hefeaussaat ein größerer Zuckerrest unvergoren als bei starker Hefeaussaat (vgl. Versuch 3, 6, 9, 12 mit 27, 30, 33, 36).

In der Praxis sind gerade diese kleinen unvergorenen Zuckerreste nicht unbedenklich; sie verursachen häufig das unangenehme Trübwerden des Weines — sei es, daß später nochmals die Hefegärung beginnt, oder daß Bakterien sich an der Zuckerzersetzung beteiligen.

Sowohl um die Gärung rasch einzuleiten, als auch um den Zucker möglichst vollständig zu vergären, scheint daher die Forderung der Praxis, bei der Umgärung mit großen Hefemengen zu arbeiten, nicht unbegründet. Wie werden versuchen, in einer weiteren Arbeit die Richtigkeit dieser Vermutungen experimentell zu prüfen.

Ein Phosphatid als Aktivator für Tuberkulin.

Von

H. J. Bing und **V. Ellermann.**

(Aus der Tuberkulosestation und dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität zu Kopenhagen.)

(Eingegangen am 18. Mai 1912.)

Die Einführung der cutanen Tuberkulinreaktion bedeutete nicht nur einen Fortschritt für die Erkennung der Tuberkulose; die Reaktion erwies sich auch als zur Lösung verschiedener theoretischen Fragen besonders geeignet.

So haben Pirquet und andere Forscher die Schwankungen der Reaktion während gewisser Krankheiten studiert. Ellermann und Erlandsen[1]) haben eine quantitative Messung der Reaktion zur Bestimmung der Stärke eines gegebenen Tuberkulins, sowie zum Nachweis der Sensibilisierung und des Reaktionsvermögens des Organismus benutzt. Schließlich haben Verfasser dieses Aufsatzes dargetan, und zwar gleichfalls durch Benutzung der Cutanreaktion, daß Albuminstoffe und deren Derivate in erheblichem Grade die Tuberkulinwirkung beeinträchtigen[2]). Bei diesen Untersuchungen, die eine Kontrolle gewisser Angaben von vermeintlichem Antituberkulin im Serum Tuberkulöser (Pickert und Löwenstein) bezweckten, prüften wir auch die Wirkung verschiedener Lipoide auf Tuberkulin. Es ergab sich für keins von ihnen eine hemmende Wirkung; im Gegenteil in gewissen Fällen eine Verstärkung. Dies Resultat war uns etwas überraschend und schien uns so interessant, daß es eine genauere Untersuchung verdiente.

Die vorliegende Arbeit besteht in einer Prüfung der Wirkung irgendeines Stoffes auf das Tuberkulin. Das einfachste Verfahren wäre, gleichzeitig und mit der gleichen Tu-

---

[1]) Ellermann und Erlandsen, Brauers Beiträge **14** und **16**.

[2]) Bing und Ellermann, Revue de médecine 1911. Festschr. f. Lépine.

berkulinstärke zwei Cutanreaktionen auszuführen, wobei der einen Lösung der Stoff zugesetzt wäre, dessen Wirkung man zu untersuchen wünscht. Dann wäre der Unterschied in der Breite der beiden Papeln maßgebend für die Wirkung des betreffenden Stoffes, vorausgesetzt, daß die Bestimmungen genau wären. Dies ist jedoch bei weitem nicht der Fall. Unternimmt man nämlich eine Reihe Doppelbestimmungen mit zwei gleich starken Lösungen, so wechseln die Resultate beständig (Tabelle I). Ab und zu hat man dieselbe Papelbreite; in der Regel sind aber die Zahlen verschieden, so daß bald Nr. 1 und bald Nr. 2 am stärksten ist. Handelte es sich nun um einen Versuch mit einem indifferenten Stoff, und wäre Lösung Nr. 2 die Kontrollösung, so würde man also in gewissen Fällen das richtige Resultat erhalten, nämlich zwei gleich große Werte, in der Regel aber eine anscheinende Verstärkung oder eine anscheinende Schwächung. Es leuchtet also ein, daß man genauere Zahlen haben muß. Solche kann man nicht durch eine vermehrte Anzahl von Ritzen aufbringen, da dies für die Patienten gar zu unangenehm wäre; man kann aber den Versuch an einer Reihe verschiedener Individuen wiederholen und die mittleren Zahlen der gefundenen Papelbreiten benutzen. Wie leicht ersichtlich, bekommt man dadurch genauere Zahlen, wenn man auch nicht auf die absolute Übereinstimmung rechnen darf, die sich zufälligerweise in der Versuchsreihe Tabelle I findet.

Tabelle I.

Name	Nr. 1 mm	Nr. 2 mm	Differenz mm
A. W.	4,6	4,4	+ 0,2
J. T.	3,3	3,4	− 0,1
P. P.	2,8	2,9	− 0,1
J. D.	2,7	2,9	− 0,2
O. B.	4,2	4,3	− 0,1
M. G.	2,0	2,0	0
M. S.	1,8	1,7	+ 0,1
A. A.	3,0	2,6	+ 0,4
P. A.	2,6	2,8	− 0,2
M. S.	2,0	2,0	0
J. B.	4,0	4,0	0
Summe	33,0	33,0	Mittlere Diff.
Mittlere Zahl	3,0	3,0	0

Um zu sehen, wie viel Bestimmungen notwendig waren, berechneten wir mittels der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{d_1^2 + d_2^2 + \ldots + d_n^2}{n-1}}$$

den mittleren Fehler der in Tabelle I gefundenen Differenzen so, wie in einer Reihe von anderen in ähnlicher Weise gewonnenen.

Wir haben also folgende Reihe von Differenzen[1]) mit den dazu gehörigen Quadraten:

Tabelle II.

Differenzen	Quadrate	Differenzen	Quadrate
0,2	0,04	0,2	0,04
0,1	0,01	0,0	0,00
0,1	0,01	0,0	0,00
0,2	0,04	0,0	0,00
0,1	0,01	0,1	0,01
0,0	0,00	0,1	0,01
0,1	0,01	0,0	0,00
0,4	0,16	0,2	0,04
0,2	0,04	0,0	0,00
0,0	0,00	0,2	0,04
0,0	0,00	0,6	0,36
0,6	0,36	0,4	0,16
0,1	0,01	0,1	0,01
0,2	0,04	0,6	0,36
0,2	0,04	0,4	0,16
0,1	0,01	Summe	1,97

$$\sigma = \sqrt{\frac{1,97}{30}} = 0,27 \text{ mm.}$$

Wendet man z. B. 9 Doppelbestimmungen an, so hat man

$$\sigma_9 = \frac{0,27}{\sqrt{9}} = 0,09 \text{ mm.}$$

Aus dem Fehlergesetz weiß man nun, daß die Differenz zwischen mittleren Zahlen von 9 Doppelbestimmungen so gut wie nie größer sein wird als $3 \times 0,09$ mm. Die Fehlergrenze ist also 0,3 mm, und Differenzen, die größer sind als 0,3 mm, können als reell betrachtet werden. Da die Ausschläge, mit denen wir bei den Versuchen zu tun haben, gewöhnlich 0,5 bis 1 mm oder mehr betragen, gewinnen wir somit durch die Anstellung von 9 Bestimmungen eine hinlängliche Genauigkeit.

[1]) Wir benutzten die Differenzen als solche, ohne sie in Prozenten der Papelbreite umzurechnen, indem wir annahmen, daß die Differenzen von den Papelbreiten unabhängig seien.

Die Ausführung der Ritze und Messung der Papeln geschah in der von Ellermann und Erlandsen früher angegebenen Weise („Das Gesetz der kutanen Tuberkulinreaktion usw." Brauers Beiträge 16.)

Versuche.

Bei den ersten Versuchen benutzten wir eine Mischung verschiedener Lipoide von Eidottern, um zu prüfen, ob diese Stoffe wie die Albumine die Tuberkulinwirkung beeinträchtigten. Die angewendete Lipoidmischung wurde in folgender Weise hergestellt: Vier Dotter werden in einem Scheidetrichter mit einer geringen Menge Alkohol geschüttelt, danach mit Äther ausgeschüttelt; es wird neuer Äther zugesetzt, wieder ausgeschüttelt usw., im ganzen 3 mal. Die gemischten Ätherextrakte werden etwas eingedampft und mit Aceton gefällt. Es bildet sich ein reichlicher gelbweißer Niederschlag, der mit Aceton gewaschen, in Äther gelöst und wieder mit Aceton gefällt wird. Der gewonnene Stoff ist eine gelbrote, zähe Masse, die mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung durch Anrührung in einem Mörser leicht emulgiert wird. Die Stärke der Emulsion wird durch Eindampfung und Wägung des Restes bestimmt.

Zur Erleichterung des Verständnisses wird der erste Versuch ausführlich dargestellt; später teilen wir, um Platz zu ersparen, nur mittlere Zahlen und Differenzen mit.

Bei allen Versuchen wurde eine 2%ige Alttuberkulinlösung angewandt.

Versuch 1 zeigt, daß die Lipoide eine bedeutende Verstärkung bewirkt haben, da der Ausschlag + 0,9, weit außerhalb der Fehlergrenze liegt.

Eine ähnliche Emulsion wurde bei den folgenden Versuchen angewandt, die im ganzen genommen dasselbe Resultat, eine Verstärkung der Tuberkulinreaktion, ergaben[1]).

---

[1]) Durch einen besonderen Versuch überzeugten wir uns davon, daß die geringe Acetonmenge im Niederschlag gleichgültig sei. Die Zahlen waren { Acetonversuch: 3,1 / Kontrolle: 3,1 } Differenz 0.

Versuch 1.

Tabelle III.

Datum	Name	1 %ige Lipoidemulsion mm	Kontrolle mm	Differenz
28. II. 1910	J. C.	4,1	3,0	+0,9
„	G. S.	3,0	1,4	+1,6
29. II. 1910	S. N.	3,9	4,2	−0,3
„	C. V.	3,0	2,7	+0,3
„	H. L.	1,9	0,5	+1,4
„	E. J.	4,9	4,0	+0,9
„	A. R.	0,7	0,5	+0,2
30. II. 1910	J. N.	3.7	2,1	+1,6
„	J. G.	5,0	4,4	+0,6
	Summe	30,2	22,8	+7,4
	Mittel	3,4	2,5	+0,9

	Lipoide 1 % mm	Kontrolle mm	Differenz
Versuch 2:	3,2	1,9	+1,3
Versuch 3:	4,9	4,3	+0,6
Versuch 4:	4,1	3,4	+0,7
Versuch 5:	3,5	2,8	+0,7

In den beiden nächsten Versuchen versuchten wir eine Verdünnung der Lipoidemulsion, und zwar mit dem Resultat, daß bei einer Stärke von 0,1 % eine deutliche Wirkung, bei 0,01 % aber keine Wirkung vorhanden war.

Versuch 6.

Lipoide 0,1 %	Kontrolle	Differenz
3,6 mm	3,0 mm	+0,6

Versuch 7.

Lipoide 0,01 %	Kontrolle	Differenz
3,4 mm	3,5 mm	−0,1

Nachdem wir durch diese Versuche die verstärkende Wirkung festgestellt hatten, galt es demnächst zu untersuchen, welcher Stoff oder welche Stoffe der Mischung die Wirkung ausübten.

Die Herstellung der Stoffe geschah in der von Stern und Thierfelder angegebenen Weise, die wiederum auf Books Entwässerungsmethode durch Eintrocknen und Erlandsens Nachweis der leichten Oxydation gewisser Phosphatide im Lichte beruht. Die Stoffe wurden im Dunkeln unter Kohlensäure oder im Vakuum aufbewahrt; alle Arbeit geschah bei gedämpftem künstlichem Licht, die Kolben wurden mit mehreren Schichten braunen Papiers umwickelt usw. Wir unterzogen die hergestellten Stoffe keiner eingehenden chemischen Analyse, da eine solche nicht im Plan der Arbeit lag; indessen hatten wir unzweifelhaft

dieselben Stoffe vor uns wie Stern und Thierfelder, da die Herstellung wie von diesen Forschern angegeben verlief, und da die gewonnenen, gereinigten Stoffe sich, was Löslichkeit und allgemeine Eigenschaften betrifft, ganz wie Stern und Thierfelders Stoffe verhielten.

10 Dotter werden in dünner Schicht in flachen Schälchen ausgebreitet und mittels eines elektrischen Ventilators 14 Stunden hindurch getrocknet. Die hornartigen Kuchen werden abgeschabt und in kleine Stücke geschnitten, die 2 Stunden hindurch in derselben Weise getrocknet werden. Darauf wird die Masse mit wasserfreiem Äther (1 l) übergossen und bei 15° in einem wohlgeschlossenen Behälter unter Kohlensäure im Dunkeln gelassen. In Zwischenräumen von einigen Tagen wird der Ätherextrakt abgegossen und neuer Äther zugesetzt. Der gesamte Ätherextrakt wird im Vakuum bei 18° bis zu einem Volumen von 150 ccm eingedampft. Es hat sich ein geringer Niederschlag gebildet, der bei leichter Erwärmung verschwindet. Es werden 1500 ccm Aceton zugesetzt, wodurch ein reichlicher flockiger Niederschlag entsteht. Nach Stehenlassen bis zum nächsten Tage wird der Niederschlag abzentrifugiert. Das Aceton ist stark gelb gefärbt. Der Niederschlag löst sich fast vollständig in 100 ccm reinem Äther; zu der leicht trüben Lösung wird 1 l Aceton gesetzt, wodurch ein reichlicher weißlicher Niederschlag entsteht. Am nächsten Tage wird der Niederschlag abzentrifugiert und durch Aufschlämmung in Aceton und Zentrifugierung gereinigt. Der Niederschlag wird in 50 ccm reinem Äther gelöst, wobei ein Teil aufgelöst, ein Teil nicht aufgelöst wird und durch die Zentrifugierung als schneeweiße Masse gewonnen wird; diese wird durch wiederholte Aufschlämmung in Äther und Zentrifugierung gereinigt („Weiße Substanz“ oder „Albin“).

Die Ätherlösung wird mit 750 ccm Aceton gefällt. Der Niederschlag wird von der leicht opalisierenden Flüssigkeit abzentrifugiert; letztere ist nicht gelb gefärbt. Der Niederschlag wird mit Aceton aufgeschlämmt und abzentrifugiert. Danach wird er mit 40 ccm reinem Äther übergossen, wodurch ein Teil aufgelöst wird, ein Teil unaufgelöst bleibt. Nach der Zentrifugierung hat man letzteren Teil als schneeweiße Masse, die der ersten Portion „weißer Substanz“ beigegeben wird. Der in Äther lösliche Teil bildet eine klare Lösung von gelblicher Farbe. Nach Eindampfung im Vakuum bei 17° erhält man einen Rest, der teils weißlich, teils gelbbraun ist. Es werden 30 ccm Methylalkohol zugesetzt, wodurch die stark klebrige Masse allmählich blasser und härter wird, während der Alkohol sich gelblich färbt. Die alkoholische Lösung wird im Vakuum bei 38° eingedampft; der Eindampfungsrest wird mit Aceton gewaschen und im luftleeren Exsiccator über Schwefelsäure aufbewahrt („Lecithin“).

Der in Methylalkohol nicht lösliche Teil wird in 20 ccm reinem Äther vollständig zu einer gelblichen Lösung aufgelöst. Durch Zusatz von 100 ccm Methylalkohl erhält man reichliche Fällung. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, wieder mit Methylalkohol aufgeschlämmt und wieder abzentrifugiert. Der Methylalkohol wird bei 40° vollständig ab-

gedampft, worauf der Rest in 10 ccm reinem Äther gelöst wird. Ein geringer ungelöster Rest wird durch Zentrifugierung entfernt. Die ätherische Lösung wird bei 18° bis zur Trockne eingedampft und der Rest im leergepumpten Exsiccator über Schwefelsäure aufbewahrt („Cephalin").

Wir haben also aus dem Acetonniederschlag des primären Ätherextraktes die drei Stoffe gewonnen:

1. Albin ist der in Äther nicht lösliche Teil des Acetonniederschlages des Ätherextraktes. In frisch gefälltem Zustand ist es eine schneeweiße, sich bei Zentrifugierung gut sammelnde Masse. Nach Eintrocknung bildet es eine glasklare Haut. Es wurden im ganzen 0,1125 g gewonnen. Es ist in Äther nicht löslich, schwer löslich in Alkohol, leicht löslich in Chloroform. Es ist nicht hygroskopisch, und als Diaminophosphatid erleidet es beim Stehen an der Luft keine Oxydation. Das eigentümliche Verhältnis, daß dieser Stoff, obgleich er in Äther nicht löslich ist, doch aus dem Ätherextrakt gewonnen wird, ist wahrscheinlich daraus zu erklären, daß er durch andere Stoffe, die durch die Acetonbehandlung beseitigt werden, in Lösung gehalten wird. Stern und Thierfelder gebrauchen nur die Bezeichnung „weiße Substanz". Da kein Name vorgeschlagen worden ist, gebrauchen wir der Kürze halber und zur Unterscheidung von anderen Diaminophosphatiden die Bezeichnung „Albin".

2. Lecithin ist der in Methylalkohol lösliche Teil des Acetonniederschlages des Ätherextrakts. Es ist eine bräunliche, klebrige Masse, leicht löslich in Äther und Alkohol, nicht löslich in Aceton. Es ist sehr hygroskopisch und nur haltbar, wenn es vor Licht und Luft geschützt ist. Es wurden im ganzen 0,3640 g gewonnen.

3. Cephalin ist der in Methylalkohol nicht lösliche Teil des Acetonniederschlages des Ätherextrakts. In frisch gefälltem Zustande ist es ein weißer, flockiger Niederschlag. Es ist in Äther leicht mit gelblicher Farbe löslich. Nach Abdampfung des Äthers bleibt es als bräunliche Masse zurück; diese bildet eine glatte Haut und hat ein ganz anderes Aussehen als das Lecithin. Es wurden im ganzen 0,0906 g gewonnen.

Außer der hier erwähnten Probe von Albin wurden noch ein paar Präparate hergestellt, die im ganzen genommen mit ersterer übereinstimmten. Bei der zweiten Herstellung, wobei eine größere Anzahl Eier angewendet wurde, wurden im ganzen 0,952 g, bei der dritten 0,117 g gewonnen.

Versuch 8[1]).

0,3% Albin A	Kontrolle	Differenz
4,4 mm	3,7 m	+ 0,7

[1]) In diesem und allen folgenden Versuchen wurde die Emulsion aus einer bestimmten Gewichtsmenge der Substanz hergestellt und die Stärke durch Eindampfung eines abgemessenen Volumens kontrolliert.

Versuch 9.

0,4% Lecithin	Kontrolle	Differenz
2,9 mm	2,9 m	0

Versuch 10.

0,4% Cephalin	Kontrolle	Differenz
3,3 mm	3,4 m	— 0,1

Es ergab sich also, daß die Verstärkung der Tuberkulinwirkung nur von dem einen Stoffe der Lipoidmischung, nämlich dem Albin, herrührt. Dagegen war das reine Lecithin, wie in I. Bangs[1]) Versuch mit Kobragifthämolyse, unwirksam. Das Cephalin, das in unreinem Zustande das Kobragift bei Bangs Versuch aktivierte, war gegenüber Tuberkulin unwirksam.

Weitere Versuche mit Albin bestätigten das gewonnene Resultat.

Versuch 11.

0,3% Albin B	Kontrolle	Differenz
3,4 mm	2,5 mm	+ 0,9

In den beiden folgenden Versuchen wurde die Stärke der Albinemulsion abgeändert.

Versuch 12.

0,9% Albin A	Kontrolle	Differenz
3,5 mm	2,9 mm	+ 0,6

Versuch 13.

0,03% Albin C	Kontrolle	Differenz
3,3 mm	2,4 mm	+ 0,9

Aus Versuch 12 geht hervor, daß eine Vermehrung der Albinmenge von 0,3% ins dreifache keine Steigerung der Tuberkulinwirkung ergibt. Versuch 13 zeigt, daß das Albin noch bei 0,03% oder $^1/_3$ der Konzentration, in der die gemischten Phosphatide wirksam waren, nämlich 1% (siehe Versuch 6), vollkommen wirksam ist, und da die niedrigste Grenze der Wirksamkeit des Albins noch niedriger liegt, wird das Vorhandensein von Albin in der Phosphatidmischung, von der es ca. $^1/_5$ ausmacht, deren Wirkung auch quantitativ erklären können.

Außer mit Albin, Lecithin und Cephalin haben wir mit mehreren anderen Lipoiden, zuvörderst mit den übrigen Eidotterlipoiden, Versuche angestellt.

---

[1]) Bang, diese Zeitschr. **11**, 1908.

Bei der Herstellung vom Alkoholextrakt wurde in folgender Weise verfahren: 12 Dotter wurden, wie oben beschrieben, getrocknet, wonach die Masse in einer kleinen Handmühle vermahlen wurde. Das entstandene recht feine Pulver wurde mit 4 Portionen reinem Äther bei 17° extrahiert. Die letzte Portion Äther war farblos und ergab keine Fällung mit Aceton. Ohne Berücksichtigung der etwa noch übrigen kleinen Mengen ätherlöslicher Stoffe wurde der Rest des Äthers durch leichte Erwärmung in einem flachen Schälchen aus dem Pulver entfernt und 1 l 96%igen Alkohol aufgegossen. Die Extraktion geschah bei 17°. Der Alkohol wurde einige Male erneuert; die ersten Auszüge waren kräftig gelb. Der gesamte Extrakt wurde nun bei 40° im Vakuum abgedampft, wodurch eine reichliche, honigähnliche, bräunliche Masse als Rückstand gewonnen wurde. Sie löst sich klar in Äther und gibt bei Zusatz von Aceton einen reichlichen Niederschlag, der in Äther gelöst und wieder mit Aceton gefällt wird. Es handelt sich also um einem Stoff, der an Aussehen und Löslichkeitsverhältnisse dem Lecithin gleicht. Die chemische Zusammensetzung untersuchten wir nicht, und wir können uns leider nicht auf Stern und Thierfelder stützen, da die in Aussicht gestellte Arbeit über den Alkoholextrakt des Dotters noch immer nicht erschienen ist. Wir verwahrten den Stoff im leergepumpten Exsiccator über Schwefelsäure, vor Licht geschützt, und verwandten ihn bei Versuchen unter der Bezeichnung „Alkohollecithin".

Versuch 14.

1,4% Alkohollecithin	Kontrolle	Differenz
2,4 mm	2,3 mm	+ 0,1

Das Aceton, das den lecithinartigen Stoff gefällt hat, wird filtriert und im Vakuum bei 18° eingedampft. Der Rückstand ist eine halbflüssige, gelbbraune, in Äther lösliche Masse. Mit Aceton ergibt die ätherische Lösung eine leichte Trübung, die bei weiterem Zusatz von Aceton schwindet.

Versuch 15.

2% acetonlöslicher Stoff	Kontrolle	Differenz
2,6 mm	2,8 mm	— 0,2

Aus dem Extrakt mit kaltem Alkohol sind also zwei Stoffe hergestellt worden, ein acetonunlöslicher und ein acetonlöslicher, die sich beide gegenüber Tuberkulin als indifferent erwiesen haben.

Da sich mit kaltem Alkohol (17°) nicht mehr extrahieren ließ, gingen wir zur Extraktion mit warmem Alkohol bei 45° in 30 Minuten über. Nach Abkühlung des Extrakts entstand kein Niederschlag. Eindampfung ergab kleine Mengen von ätherlöslicher, mit Aceton zu fällender Substanz. Schließlich wurde die Masse 5 Minuten mit kochendem Alkohol behandelt. Das Alkoholextrakt ergab bei Abkühlung keinen Niederschlag, die Eindampfung nur eine geringe Menge eines ähnlichen Stoffes, wie im Extrakt mit warmem Alkohol. Dies Resultat überraschte uns insofern, als wir uns die Möglichkeit vorgestellt hatten, cerebrosidartige

Stoffe zu gewinnen. Auch das von Fränkel und Buffalio hergestellte Triaminomonophosphatid, Neottin, das bei Abkühlung aus dem warmen Alkoholextrakt krystallieren sollte, ist also nicht bei unseren Versuchen entstanden. Schließlich hatten wir uns die Möglichkeit vorgestellt, im Alkoholextrakt größere Mengen des obenerwähnten Diaminophosphatids, Albin, anzutreffen, eine auch von I. Bang angeführte Möglichkeit. Dieser Stoff scheint aber trotz seiner Unlöslichkeit in Äther in ganz wesentlichem Grade in den primären Ätherextrakt übergegangen zu sein. Die Erklärung dieses anscheinend paradoxalen Verhältnisses wurde oben besprochen.

Vollständigkeitshalber wurden noch folgende Stoffe untersucht: Cholesterin, Ölsäure und ölsaures Natron, die sich alle als unwirksam erwiesen.

Versuch 16.

0,5% Cholesterin	Kontrolle	Differenz
3,0 mm	3,0 mm	0

Versuch 17.

0,5% Ölsäure	Kontrolle	Differenz
2,0 mm	2,0 mm	0

Versuch 18.

0,5% ölsaures Natrium	Kontrolle	Differenz
3,7 mm	3,7 mm	0

Von allen herangezogenen Lipoiden ist also nur eins, nämlich das Albin, wirksam. Dieser Stoff steigert die Wirkung des Tuberkulins bis zum zweifachen, indem eine Zunahme der Papelbreite von ca. 0,7 mm ungefähr einer Verdoppelung der Konzentration entspricht. Fragt man sich nun, wie die Wirkung zustande kommt, so lassen sich verschiedene Erklärungen denken: 1. Der Stoff könnte reizend auf die Haut wirken und dadurch die Wirkung steigern. Diese Annahme wird indessen durch eine Reihe von Versuchen widerlegt, bei denen wir die Cutanreaktion mit der Phosphatidmischung ausführten, ohne daß sich eine Hautreaktion ergab, weder bei denjenigen, die auf Tuberkulin reagierten, noch bei denen, die nicht reagierten. 2. Der Stoff könnte eine direkte verstärkende Wirkung auf Tuberkulin ausüben (durch Katalyse, chemische Bindung oder anderswie). 3. Der Stoff könnte indirekt wirken, z. B. indem er die Wirkung eines hemmenden Stoffes aufhebt. — Es ist uns augenblicklich nicht möglich zu entscheiden, welche von den beiden letzteren Möglichkeiten die rechte ist. Das Tuberkulin ist ja kein reiner Stoff, sondern enthält außer dem wirksamen

Bestandteil, der noch nicht in reinem Zustand hergestellt wurde, Albumosen, Peptone, Glycerin, Salze und andere Stoffe. Es enthält also Stoffe, die tatsächlich seine Wirkung schwächen, und es ließe sich also denken, daß ein Aktivator die Hemmungsstoffe beeinflusse.

Wir besprechen noch kurz ein paar Versuche, die von uns mit anderen Tuberkulinpräparaten angestellt wurden. Das erste davon wurde hergestellt durch wiederholte Fällungen von gewöhnlichem Alttuberkulin mit Alkohol. Das Präparat ergab sich durch Standardisierung als 5mal schwächer als das ursprüngliche Präparat, weshalb wir 10%ige Lösungen zum Versuche anwandten. Die Aschenmenge, die bis auf $^1/_5$ hinabgegangen war, erreichte dadurch ihre ursprüngliche Höhe, 0,2%[1]).

Versuch 19.

0,3% Albin	Kontrolle	Differenz
3,6 mm	2,9 mm	+0,7

Bei einem anderen Versuch verwendeten wir das von Lucius und Brüning hergestellte „albumosenfreie Tuberkulin". Dieses Präparat ist durch Züchtung von Tuberkelbacillen auf einem Asparagin als Stickstoffquelle enthaltenden Nährboden gewonnen. Durch eine Analyse, die Herr Prof. Dr. med. V. Henriques gütigst in seinem Laboratorium ausführen ließ, zeigte es sich, daß das Präparat 0,22% Totalstickstoff enthielt. Davon vertraten 0,12% den Ammoniakrest; es war also 0,1% Stickstoff nicht als Ammoniak vorhanden. Da es sich zeigte, daß die Hauptmasse davon sich durch Formol titrieren ließ, indem 0,084% Aminostickstoff vorgefunden wurde, muß man annehmen, daß die Proteinmenge ganz minimal ist. Geht man davon aus, daß der gefundene Aminostickstoff dem Rest des Asparagins des Substrates entspricht, so wird das Präparat 0,78% Asparagin enthalten, und in der 10%igen Lösung, die bei Versuch 20 angewendet wurde, würden sich 0,08% finden.

Versuch 20.

1% Phosphatidmischung	Kontrolle	Differenz
1,9 mm	1,4 mm	+0,5

Auch bei diesem Versuch haben wir im Tuberkulin eine Beimischung von Hemmungsstoffen, wenn auch in geringer Menge.

[1]) Es ergab sich als gleichgültig für die Albinverstärkung, ob zur Emulsion und Kontrollösung Wasser oder 0,9%ige Kochsalzlösung angewandt wurde.

Wir können es also als Tatsache feststellen, daß Albin die Tuberkulinwirkung verstärkt, ohne daß wir doch über die eigentliche Natur des Prozesses mit Sicherheit etwas entscheiden können, indem es vorläufig dahingestellt bleiben muß, ob es sich um eine direkte Wirkung auf das Tuberkulin handelt, oder ob die Wirkung auf einer Bindung von Hemmungsstoffen beruht. Indessen kann es möglicherweise für das Verständnis der Tuberkulinwirkung im Organismus von Bedeutung sein zu wissen, daß sich darin sowohl Hemmungsstoffe als Aktivatoren finden. Was speziell die Reaktion betrifft, die durch Einspritzung von Tuberkulin an Tuberkulosepatienten entsteht, möchte man sich versucht fühlen, auf Grund der hier angeführten Versuche eine Theorie aufzustellen. Indessen ist der Prozeß in vielen Beziehungen noch immer so dunkel, daß eine genauere Gestaltung der Theorie sicherlich verfehlt sein würde. Trotz des Unterschiedes zwischen der Tuberkulinwirkung und des typischen anaphylaktischen Choks, ist es doch nicht ausgeschlossen, daß anaphylaktische Prozesse eine Rolle spielen. Andererseits machen unsere Versuche auf die Möglichkeit aufmerksam, daß die „lokale Reaktion" ganz oder teilweise einer Aktivierung des Tuberkulins durch die in den caseösen Massen vorhandenen Lipoide zuzuschreiben wäre[1]).

Versuch 21.

Lipoide 1 %	Kontrolle	Differenz
1,8 mm	0,9 mm	+ 0,9

Hieraus erhellt, daß Lipoide von tuberkulösem käsigem Gewebe Tuberkulin wie Albin aus Eidotter aktivieren.

[1]) Wir haben deswegen einen einzelnen Versuch mit Lipoiden angestellt, die aus tuberkulösem Gewebe hergestellt waren. 500 g aus Lymphdrüsen, Lunge und Leber bestehendes tuberkulöses Gewebe mit zahlreichen miliaren Knötchen und größeren käsigen Massen werden zerhackt und sodann zu wiederholten Malen mit einer reichlichen Menge 96%igem Alkohol extrahiert (die Eintrocknungsmethode ließ sich der Ansteckungsgefahr wegen nicht anwenden). Der Extrakt wird im Vakuum bei 45° bis auf ein Volumen von 100 ccm eingedampft, sodann mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherextrakt wird etwas eingedampft und mit Aceton gefällt, wodurch ein reichlicher Niederschlag entsteht, der mit Aceton gewaschen und zum Versuch mit dem gewöhnlichen Alttuberkulin in 2%iger Lösung verwendet wird.

Wir versuchten aus der Acetonfällung Albin herzustellen; es ergaben sich aber hier andere Verhältnisse als beim Dotterextrakt, weshalb wir eine nähere Analyse aufgaben.

Schließlich erwähnen wir kurz einige der übrigen biologischen Reaktionen, bei denen Lipoide aktivierend wirken. Küttner[1]) hat dargetan, daß die Pepsinwirkung durch käufliches Lecithin verstärkt wird. Die Wirkung beruht wahrscheinlich auf Aufhebung einer Hemmung, die von einer Beimischung fremder Stoffe herrührt. Eine ähnliche Aktivierung ergab sich gegenüber Trypsin und Pankreaslipase. Lapidus[2]) fand gegenüber Diastase bald Hemmung, bald Aktivierung. Wir berührten oben die Aktivierung der Kobragifthämolyse durch Dotterlipoide. Kyes[3]), der diese Reaktion entdeckt hat, meinte, daß das Lecithin hier das wirksame Prinzip abgebe. Indessen wurde später von I. Bang dargetan, daß reines Lecithin ganz unwirksam ist, während der wirksame Stoff sich als Beimischung im Cephalin findet. Endlich zeigte Meyerstein[4]), daß es keine Phosphatide sind, die das Kobragift aktivieren, sondern die ungesättigten Fettsäuren. — Was den Mechanismus dieser verschiedenen Aktivierungsprozesse betrifft, so ist es wohl zurzeit nicht möglich, eine allgemein gültige Erklärung zu liefern, indem es sich um recht verwickelte und verschiedenartige Prozesse handelt. Außerdem sind die betreffenden Stoffe nichts weniger als rein.

Zusammenfassung.

1. Aus Eidotter läßt sich ein Diaminophosphatid, Albin, gewinnen, das imstande ist, die Wirkung des Tuberkulins bei der cutanen Reaktion zu verstärken.

2. Keins der übrigen untersuchten Lipoide (Lecithin, Cephalin, Cholesterin, Ölsäure, ölsaures Natron u. a. m.) hatte eine verstärkende Wirkung.

3. Eine Aktivierung des Tuberkulins mag für die Wirkung des Tuberkulins auf den tuberkulösen Organismus eine Rolle spielen.

4. Aus dem sekundären Alkoholextrakt von Eidotter haben wir fett- und lecithinartige Stoffe hergestellt. Dagegen gelang es uns nicht, weder Albin noch cerebrosidartige Stoffe oder Neottin herzustellen.

---

[1]) Küttner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50.

[2]) Lapidus, nach Bang: Chem. u. Biochem. d. Lipoide.

[3]) Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1902, Nr. 38.

[4]) Meyerstein, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 32, 1910.

Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Blutserums und des Harnes von Hunden nach Schilddrüsenexstirpation.

Von

Raffaele Paladino.

(Aus dem chemisch-physiologischen Institut der Universität zu Neapel.)

(Eingegangen am 18. Mai 1912.)

In dieser Vorarbeit, der ich binnen kurzem eine eingehende Arbeit über den Stoffwechsel des Phosphors, des Stickstoffs und des Kalkes bei den der Schilddrüse beraubten Tieren folgen lassen werde, beschränke ich mich darauf, kurz einige Tatsachen über das Verhalten der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Blutserums und des Harns bei solchen Tieren anzugeben. Ähnliche, bereits von anderen Forschern angestellte Untersuchungen haben meist zu widersprechenden Schlußfolgerungen geführt.

Die meisten behaupten, daß nach Entfernung der Schilddrüse und der Paratyroidea bei Hunden und Kaninchen das Blutserum etwas zäher werde, während Burton-Opitz fand, daß es von seiner Viscosität einbüßt. Segale fand bei der Untersuchung der Viscosität, des osmotischen Druckes und der elektrischen Leitfähigkeit des Hundeblutserums, daß die erstere abgenommen hatte, während der osmotische Druck sowie die elektrische Leitfähigkeit keine erheblichen Veränderungen aufwiesen. Capobianco fand an 3 Hunden den Δ-Wert von 0,65 auf 0,59 gesunken; dem ersten Hunde hatte er sowohl Schilddrüse als auch die Paratyroidea fortgenommen, dem zweiten nur die Schilddrüse, dem dritten nur die Paratyroidea. Letzthin kam auch Eloisa Gardella bei ihrem Studium des Hundeserums zu der Annahme, daß die Viscosität des Blutserums nach Fortnahme der Paratyroidea zunimmt, während das elektrische Leitvermögen keine nennenswerten Veränderungen erleidet, obgleich dasselbe die Neigung zum Abnehmen zeigt und der osmotische Druck ziemlich bedeutend abnimmt.

Meine Untersuchungen erstreckten sich gleichzeitig auf Normaltiere und auf solche, denen die Paratyroidea entfernt

war. Ich verwendete stets ausgewachsene Hunde vom Gewichte von 6 bis 7 kg; dieselben verblieben gewöhnlich einige Tage im Institut bei einer Nahrung, die aus 300 ccm Milch und 400 g Brot bestand. Diese Nahrung blieb immer dieselbe, ausgenommen natürlich für die operierten Tiere, die gleich in den ersten Tagen nach der Operation nur Milch zu sich nahmen und jede andere Nahrung zurückwiesen. Außer der Viscosität und der elektrischen Leitfähigkeit untersuchte ich auch die Oberflächenspannung des Blutserums sowie des Harns des Normaltieres und darauf desselben Tieres, nachdem ich ihm Schilddrüse und Paratyroidea entfernt hatte; gewöhnlich nach einigen Tagen wurde dem Tiere zur Gewinnung des Serums ein mäßiges Quantum Blut entzogen, und gleichzeitig wurde vom Harn der letzten 24 Stunden eine kleine Menge entnommen. Bei einigen der von mir operierten Hunde zeigten sich die charakteristischen Symptome sehr bald, manchmal schon am zweiten Tage nach der Operation, bei anderen erst mehrere Tage darauf; in einem Falle, in dem dem Tiere eine kleine Nebentyroidea geblieben war, zeigten sich anfangs die Symptome, um dann allmählich wieder zu verschwinden. Bei sehr ausgeprägten Symptomen fing ich zugleich mit einer kleinen Menge Blut auch den Harn auf. Das Blut wurde 24 Stunden stehen gelassen, das Serum dann dekantiert und nach Zentrifugation der Untersuchung unterzogen. Zur Bestimmung der Viscosität benutzte ich stets Prof. Scarpas Meßapparat, die elektrische Leitfähigkeit bestimmte ich nach Kohlrausch; zur Feststellung der Oberflächenspannung wendete ich den bequemen Apparat von Scarpa an. Alle Bestimmungen fanden gewöhnlich bei Zimmertemperatur statt.

Zusammenfassung.

1. Nach Entfernung der Schilddrüse und Paratyroidea nimmt die Viscosität des Blutserums und des Harns zu.

2. Die elektrische Leitfähigkeit des Serums und des Harns sinkt ziemlich bedeutend.

3. Die Oberflächenspannung erleidet keine nennenswerten Veränderungen.

Die messende Spektroskopie und die Spektrophotographie als Methoden zur qualitativen Bestimmung des Oxyhämoglobins und seiner Umwandlungsprodukte.

Von

O. Schumm.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Eppendorf.)

(Eingegangen am 18. Mai 1912.)

Aus vielfachen Anfragen wie aus anderen Anzeichen läßt sich entnehmen, daß obige Methoden noch nicht zu allgemeinerer Kenntnis der interessierten Kreise gelangt sind. Die folgenden Ausführungen haben den Zweck, die Eigenart und Leistung der beiden Methoden zu erörtern und dadurch die richtige Anwendung zu fördern.

Die messende Spektroskopie (oder Spektrometrie) und die Spektrophotographie sind zwei verschiedenartige Methoden zum Studium der spektralen Absorptionsbilder, die beide bei richtiger Handhabung wissenschaftlich zuverlässige und genaue Beobachtungen und Feststellungen ermöglichen. Dagegen dient die einfache Spektroskopie, d. i. die Beobachtung der Absorptionserscheinungen mit den Handspektroskopen (Instrumente mit Spalt, Prisma und einer als Lupe wirkenden achromatischen Linse) in der üblichen Form nur zu annähernd richtigen Feststellungen des absorptiven Verhaltens eines Farbstoffes. Das schließt aber keineswegs aus, daß die Handspektroskope zur bloßen Wahrnehmung eines schwachen Absorptionsbandes sehr gut geeignet sein können[1]).

Als Spektrometrie im weiteren Sinne wäre aufzufassen die zahlenmäßige Feststellung derjenigen Werte, durch die ein beliebiges spektrales Absorptionsbild in seiner Eigenart vollkommen gekennzeichnet würde. Für die im sichtbaren Spektrum auftretenden Absorptionserscheinungen sucht man das bislang besonders mit Hilfe der verschiedenen Arten von Spekralphoto-

[1]) Experimentelle Belege hierfür: O. Schumm, Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 28; vgl. auch Medizinische Klinik 1908, Nr. 15.

metern zu erreichen, eine Methode, deren Handhabung leider mit erheblichen Schwierigkeiten und Umständlichkeiten verknüpft ist.

Als Spektrometrie im engeren Sinne möchte ich diejenige Methode der Untersuchung von Absorptionsspektren bezeichnen, die in größerem Umfange zuerst von Formánek[1]), auf dem Gebiete der klinischen Spektroskopie auch vom Verfasser angewandt worden ist[2]). Sie besteht darin, daß der Ort der einzelnen Absorptionsstreifen durch Bestimmung seiner dunkelsten Stelle (oder erforderlichenfalls seiner Mitte) festgestellt, die seitliche Begrenzung jedes Streifens bei bestimmter Konzentration und bestimmter Spaltweite zahlenmäßig ermittelt und außerdem die relative Dunkelheit nach einfacher Schätzung angegeben wird. Diese spektrometrischen Bestimmungen erfordern ein (nach Art der „physikalischen" Spektrometer) mit mikrometrischer Fernrohrbewegung, Okularmarke und symmetrischem Präzisionsspalt ausgestattetes Spektroskop, das zweckmäßig mit einer Vorrichtung zur symmetrischen Zweiteilung des Spektrums und somit zur gleichzeitigen Erzeugung und Ausmessung zweier Absorptionsspektra nebst einer geeigneten Beleuchtungsvorrichtung versehen ist. Solche Präzisionsspektroskope wären vielleicht am richtigsten als Spektrometer für physiologische und chemische Untersuchungen zu bezeichnen[3]). Damit wäre ihrer besonders wichtigen Anwendbarkeit zu genauen Messungen im Spektrum (im Gegensatz zu den einfachen Spektroskopen) Ausdruck gegeben.

Die Technik der Spektrometrie möge durch folgendes Beispiel erläutert werden:

Gegenstand der Untersuchung: Rötlich gefärbter Harn. Absorptionsbild im Gitterspektrometer bei passender (in diesem Falle 2 cm betragender) Schichtdicke: Drei deutliche Absorptionsstreifen im Rot, Gelb, Grün und ein nach Violett

[1]) J. Formánek, Die qualitative Spektralanalyse anorganischer und organischer Stoffe. 2. Aufl. Berlin 1905. Verlag von R. Mueckenberger.

[2]) O. Schumm, Klinische Spektroskopie. Jena 1909. Verlag von Gustav Fischer.

[3]) Die vom Verfasser auf Grund umfassender Untersuchungen aufgestellten Normalien für die optischen Bestandteile sind in der Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 290, 1910 und **67**, 306, 1910 angegeben worden.

nicht deutlich abgegrenzter vierter Streifen auf der Grenze von Grün und Blau, der nach dem Ergebnis der chemischen Untersuchung wenigstens zum Teil durch Urobilin bedingt ist. Er soll hier unberücksichtigt bleiben — Die drei deutlichen Absorptionsstreifen werden nun genau bestimmt. Die Messungen der Lage erfolgen unter Benutzung der Okularmarke (zweier feiner, sich rechtwinklig schneidender Linien, von denen die eine, die Meßlinie, das Spektrum genau rechtwinklig schneiden muß), indem die Meßlinie durch Drehen an der Mikrometerschraube zunächst auf beide seitlichen Begrenzungsstellen jedes Absorptionsstreifens nacheinander eingestellt und jedesmal der zugehörige Wert am Index abgelesen wird. Jede Einstellung wird einige Male wiederholt und aus den abgelesenen Werten das Mittel berechnet. Gefundene Begrenzungsstellen für den Streifen im Rot $\mu\mu$ 639 bis 621, im Gelb 548 bis 569, im Grün 548 bis 530. Eine notwendige Ergänzung dieser Messungen sind die Bestimmungen des Dunkelheitsmaximums, zu deren Ausführung man die Flüssigkeit nötigenfalls soweit verdünnt, daß der zu messende Absorptionsstreifen sich gerade noch deutlich abhebt und dann die Meßlinie möglichst genau auf die dunkelste Stelle oder, falls eine solche nicht hervortritt, auf die Mitte des Absorptionsstreifens einstellt. Für jeden Absorptionsstreifen macht man mehrere, etwa 6, solcher Einstellungen und nimmt aus den abgelesenen Werten das Mittel. Gefunden für den Streifen im Rot dunkelste Stelle: $\mu\mu$ 632, für den Streifen im Gelb dunkelste Stelle: 578, für den Streifen im Grün Mitte: 540. Außer der Lage ist noch das Intensitätsverhältnis, die relative Dunkelheit der Streifen anzugeben. Man bestimmt sie aus dem Absorptionsbilde durch einfache Schätzung oder, indem man feststellt, in welcher Reihenfolge die einzelnen Streifen bei allmählich gesteigerter Verdünnung der Flüssigkeit oder allmählich verminderter Schichtdicke unsichtbar werden[1]). Gefunden für die obige Flüssigkeit: Streifen im Rot schwächer als der Streifen im Grün; letzterer etwas schwächer als der im Gelb. Wir sind demnach zu der Annahme berechtigt, daß der untersuchte Harn Methämoglobin nebst einer beträchtlichen

[1]) Unter Benutzung der Vorrichtung zum Vergleichen zweier Spektra läßt sich das Intensitätsverhältnis natürlich auch genauer, und zwar zahlenmäßig ermitteln, doch soll dieses kompliziertere Verfahren hier nicht berücksichtigt werden.

Menge Oxyhämoglobin enthält; denn andere etwa in Betracht kommenden Farbstoffe würden wesentlich abweichende Absorptionserscheinungen liefern[1]). Will man noch weiter gehen, so kann man sich aus frischem Blut und Harn (Rinderblut oder Pferdeblut genügt) durch vorsichtigen Zusatz von Ferricyankaliumlösung leicht eine Methämoglobin enthaltende Vergleichsflüssigkeit herstellen und unter Benutzung der an dem Spektrometer vorhandenen Vorrichtung zur Teilung des Spektrums gleichzeitig das schon untersuchte und das Spektrum des künstlich hergestellten Gemisches beobachten.

Hinsichtlich der Genauigkeit der Messungen ist folgendes zu bemerken. Die Werte für die seitlichen Begrenzungsstellen können oft nur annähernd genau ermittelt werden, da manche Absorptionsstreifen nicht genügend scharf gegen das helle Nachbargebiet abgegrenzt sind. Die Einstellungen auf die dunkelste Stelle (oder die Mitte) der Absorptionsstreifen lassen sich bei deutlichen Streifen mit befriedigender Genauigkeit ausführen. Als Belege führe ich folgende Beispiele aus meinen eigenen Untersuchungen an: Lösung mehrere Tage alten Pferdeblutes in schwach sodahaltigem Wasser; Ortsbestimmung des Absorptionsstreifens im Gelb durch Messung der dunkelsten Stelle mit einem Gitterspektrometer[2]). Es wurden mit Unterbrechungen von $^1/_4$ bis 1 Minute als Ruhepause für das Auge nacheinander 20 Messungen ausgeführt und dabei folgende Einstellungswerte am Index abgelesen: 1041, 1041, 1041, 1042, 1042, 1040, 1041, 1041, 1041, 1041, 1041, 1041, 1041, 1040, 1041, 1041, 1042, 1042, 1041, 1040; Mittel 1041. Je 3,4 Intervalle der Meßtrommel entsprechen 1 $\mu\mu$. Die Meßschraube ist so eingerichtet, daß bei der Einstellung auf 1000 das Fadenkreuz des Okulars mit der Mitte der beiden D-Linien ($\mu\mu$ 589,3) zusammenfällt. Bei der Einstellung z. B. auf 1034 steht das Fadenkreuz auf $\mu\mu$ 579; bei der Einstellung auf 1068 auf $\mu\mu$ 569 usw. Der gefundene Mittelwert 1041 ent-

[1]) Auf die Möglichkeit einer Verwechslung mit dem Rotstreifen des sauren Hämatins braucht man nach meinen Erfahrungen bei Harn keine Rücksicht zu nehmen. Der Streifen des alkalischen Hämatins hat eine erheblich abweichende Lage. Zur Erhärtung der Befunde stehen noch spezielle spektroskopisch-chemische Reaktionen zur Verfügung, deren Besprechung zu weit führen würde.

[2]) Vgl. O. Schumm, Zeitschr. f. Physiol. Chem. **66**, 287, 1910.

spricht, wie eine einfache Rechnung beweist, $\mu\mu$ 576,93 oder rund 577. Da der Wert 1040 $\mu\mu$ 577,2 und der Wert 1042 $\mu\mu$ 576,6 entspricht, die größte Abweichung bei den 20 Einzelmessungen also weniger als 1 $\mu\mu$ beträgt, so muß das Ergebnis als ein sehr befriedigendes bezeichnet werden. Denn es beweist, daß man durch die einfache spektrometrische Untersuchung den Ort eines Absorptionsstreifens im Spektrum mit ausreichender Genauigkeit bestimmen kann. Das ist aber praktisch von größter Bedeutung, da der richtige Wert für den Ort des Absorptionsstreifens (dunkelste Stelle oder Mitte, gemessen bei dem oben näher bezeichneten Verdünnungsgrade) nach Krüß und Oekonomides das zuverlässigste Kennzeichen zu seiner und damit des fraglichen Farbstoffs Identifizierung bildet[1]). Die Genauigkeit der Ortsbestimmung ist natürlich um so geringer, je breiter und „verwaschener" die Absorptionsstreifen sind. Z. B. läßt sich der Rotstreifen des Methämoglobins und auch der Grünstreifen des Oxyhämoglobins nicht so genau bestimmen wie der Gelbstreifen des Oxyhämoglobins. Bei 10 Einzelmessungen des Grünstreifens einer Lösung, die neben reichlich Methämoglobin wenig Oxyhämoglobin enthielt, fand ich folgende Werte: 1162, 1166, 1163, 1163, 1164, 1163, 1166, 1161, 1161, 1164; Mittel = 1163,3 = $\mu\mu$ 541. Der Wert 1161 entspricht $\mu\mu$ 541,6, der Wert 116 $\mu\mu$ 540,2; die größte Abweichung zwischen zwei Einzelmessungen beträgt jedoch nur 1,4 $\mu\mu$.

Als weiteres Beispiel für die Genauigkeit der spektrometrischen Ortsbestimmung diene eine Untersuchung der Absorptionsspektra des Urobilins und seiner Zinkverbindung. Die Untersuchung wurde vom Verfasser an drei verschiedenen Präparaten von Urobilin ausgeführt, das aus den urobilinreichen frischen Harnen dreier Fälle von Lungentuberkulose dargestellt worden war. (Harn mit $^1/_{200}$ Volumen Eisessig angesäuert, mit seinem gleichen Volumen Äther extrahiert, Ätherextrakt mit Wasser gewaschen, filtriert und im Wasserbad verdunstet.) Das Urobilin wurde jedesmal in Alkohol gelöst und soweit mit Alkohol verdünnt, daß der Absorptionsstreifen des Urobilins gerade noch in genügender

[1]) Vgl. auch Formánek, l. c., und H. Kayser, Handbuch der Spektroskopie. Leipzig, Verlag von S. Hirzel.

Schärfe sichtbar war, um seine dunkelste Stelle gut messen zu können. Nachdem die Ortsbestimmung ausgeführt war, wurde die Lösung mit alkoholisch-ammoniakalischer Chlorzinklösung versetzt (auf 5 ccm der Lösung 4 Tropfen einer filtrierten Verreibung aus 1 g Chlorzink und 100 ccm alkoholischer Ammoniakflüssigkeit) und nach Ablauf einer Minute der Absorptionsstreifen der entstandenen Urobilinzinkverbindung gemessen.

Urobilin I: 1327, 1324, 1328, 1325, 1328, 1326, 1326, 1326, 1325, 1328. Mittel 1326,3 = $\mu\mu$ 493. Nach Zusatz des Zinkreagens: 1278, 1278, 1277, 1278, 1277, 1277, 1278, 1278, 1277, 1277. Mittel 1277,5 = $\mu\mu$ 507,3.

Urobilin II: 1330, 1331, 1330, 1331, 1329, 1328, 1330, 1332, 1331, 1330. Mittel 1330,2 = $\mu\mu$ 492. Nach Zusatz des Zinkreagens: 1279, 1280, 1278, 1277, 1279, 1277, 1279, 1277, 1279, 1279. Mittel 1278,4 = $\mu\mu$ 507.

Urobilin III: 1329, 1330, 1329, 1330, 1331, 1330, 1331, 1330, 1331, 1330. Mittel 1330,1 = $\mu\mu$ 491,8. Nach Zusatz des Zinkreagens: 1278, 1280, 1280, 1279, 1277, 1277, 1278, 1280, 1278, 1278. Mittel 1278,5 = $\mu\mu$ 507.

Gefunden für Urobilin I: $\mu\mu$ 493; Urobilin II: $\mu\mu$ 492; Urobilin III: 491,8. Größte Abweichung zwischen den Einzelmessungen bei I: 4 Intervalle = 1,17 $\mu\mu$; bei II: 4 Intervalle = 1,17 $\mu\mu$; bei III: 2 Intervalle = 0,59 $\mu\mu$. Gefunden für die Urobilinzinkverbindung I: $\mu\mu$ 507,3; II: $\mu\mu$ 507; III: $\mu\mu$ 507. Größte Abweichung zwischen den Einzelmessungen bei I: 1 Intervall = 0,3 $\mu\mu$; bei II: 3 Intervalle = 0,88 $\mu\mu$; bei III: 3 Intervalle = 0,88 $\mu\mu$.

Die Genauigkeit dieser Resultate, die mit einem richtig konstruierten Gitterspektrometer ohne großen Zeitaufwand zu erhalten sind, kennzeichnet die messende Spektroskopie oder Spektrometrie als eine Methode, die bei sachgemäßer Anwendung einen auch für wissenschaftliche Untersuchungen ausreichenden Grad von Zuverlässigkeit hat. Das Anwendungsgebiet der Spektrometrie ist natürlich ebenso wie das anderer analytischer Methoden ein begrenztes; es umfaßt in der Hauptsache Fälle, in denen Farbstoffe mit deutlich abgegrenzten Absorptionsstreifen nachgewiesen werden sollen. Abgesehen von den sehr vielen künstlichen Farbstoffen trifft das auch bei dem roten Blutfarbstoff und seinen Abbauprodukten zu. Daraus erklärt sich die Bedeutung der messenden Spektroskopie oder Spektrometrie für die qualitative Bestimmung der letztgenannten Stoffe. Bei Farbstoffen,

die im sichtbaren Spektrum nur diffuse Absorptionserscheinungen oder einseitige Absorption an der Grenze des sichtbaren Spektrums liefern, kommt die messende Spektroskopie als qualitative Bestimmungsmethode weniger in Betracht.

In dem näher ausgeführten Sinne ist die messende Spektroskopie als souveräne Methode anzusehen, wo immer es sich darum handelt, Farbstoffe zu erkennen, die auch in kleinen Mengen ein aus mehreren deutlich abgegrenzten Streifen bestehendes ihnen eigentümliches Absorptionsbild liefern. Will man die Befunde verschiedener Untersucher miteinander vergleichen, so muß man berücksichtigen, daß die Farbenverteilung und deshalb auch der Charakter der Absorptionsbilder im Gitterspektrum, dem sog. normalen oder typischen Spektrum, ein anderer ist als im Prismenspektrum.

Der messenden Spektroskopie verwandt ist die Spektrophotographie, die meistens kurz als Spektrographie bezeichnet wird.

Wir verstehen darunter die photographische Aufnahme der Absorptionsbilder mit einem Spektralapparat, dessen Beobachtungsfernrohr durch eine geeignete photographische Kamera ersetzt ist. Ihrem Wesen nach unterscheidet sich die Spektrographie von der messenden Spektroskopie in ähnlicher Weise wie die photographische Platte von dem menschlichen Auge. Daraus hat man die Überlegenheit der Spektrographie gegenüber der spektroskopischen Untersuchung ableiten wollen. Es hieße aber das Wesen der beiden Methoden verkennen und die Grenzen ihres Anwendungsbereiches verwischen, wenn man den Satz aufstellen wollte, daß der Spektrographie ganz allgemein der Vorzug vor den spektroskopischen Methoden zu geben sei. Soweit das sichtbare Spektrum in Betracht kommt, hat die Spektrographie gegenüber der messenden Spektroskopie bislang im wesentlichen den Wert einer Methode, welche die Ergebnisse der messenden Spektroskopie mit einem von Fall zu Fall wechselnden Grade von Genauigkeit darzustellen und bei richtig gewählten Bedingungen zu bestätigen ermöglicht. Eine bedeutungsvollere Leistung der Spektrographie liegt darin, daß sie uns die Kenntnis der im Ultraviolett und Violett auftretenden, nicht oder nur undeutlich sichtbaren Absorptionserscheinungen vermittelt; sie ist die wissenschaftliche Methode

zur Untersuchung der unsichtbaren Absorptionserscheinungen, die messende Spektroskopie eine wissenschaftliche Methode zur Untersuchung der sichtbaren Absorptionsbilder.

Für die Bestimmung und Erforschung des Blutfarbstoffes und seiner Abbauprodukte dürfte in Zukunft auch die Untersuchung der unsichtbaren Absorptionserscheinungen größere Bedeutung erlangen. Ihre richtige photographische Darstellung gelingt im allgemeinen leichter als die der sichtbaren Absorptionsbilder. Ich erwähne daher nur einige Schwierigkeiten, die einer richtigen photographischen Wiedergabe der sichtbaren Absorptionsbilder entgegenstehen.

Ähnlich wie das menschliche Auge reagiert bekanntlich auch die photographische Platte auf die verschiedenen Arten von Lichtstrahlen verschieden stark, doch mit dem Unterschiede, daß unser Auge Helligkeitsunterschiede im „langwelligen" Teile des Spektrums im Vergleich zum „kurzwelligen" Teile noch ziemlich gut registriert, die gewöhnliche photographische Platte dagegen nur höchst mangelhaft. Das umgekehrte Verhalten weisen menschliches Auge und photographische Platte gegenüber dem kurzwelligen Teile des Spektrums auf. — Die Aufgabe, mehrere über das ganze Spektrum verteilte Absorptionsstreifen gleichartig wiederzugeben, könnte eine photographische Platte streng genommen nur dann sicher erfüllen, wenn man ihre Empfindlichkeit gegenüber den Lichtstrahlen verschiedener Wellenlänge so abstufen könnte, daß die photographische Platte an der jeder Lichtart des Spektrums entsprechenden Stelle in photochemischem Sinne gleich stark beeinflußt würde, was zur Folge haben würde, daß die (ohne Einschaltung einer absorbierenden Flüssigkeit) belichtete Platte bei der Entwicklung in jeder Phase an allen von Licht getroffenen Stellen gleichmäßig dunkel erscheinen würde. Der Erreichung dieses Zieles sollen die verschiedenen Verfahren der Plattensensibilisierung dienen, auf deren historische Entwicklung hier nicht näher eingegangen werden kann. Es genüge die Angabe, daß ein bedeutender Fortschritt durch die von Miethe eingeführte Sensibilisierung mit Isokol erzielt worden ist[1]), mit der man

[1]) Näheres darüber siehe bei Rost, Franz und Heise, Beiträge zur Photographie der Blutspektra. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 32, Heft 2, 1909, Berlin, Verlag v. J. Springer.

besonders die von W. Gummelt[1]) angegebene Platte zu einer empfehlenswerten Spektralplatte herrichten kann.

Trotz dieser Fortschritte ist das oben gekennzeichnete Ziel noch nicht erreicht. Auch die letztgenannte Spektralplatte ermöglicht nicht in allen Fällen eine ganz richtige Wiedergabe der sichtbaren Absorptionsbilder, wie das schon von W. Gummelt[2]) klar ausgesprochen worden ist. Bei meinen eigenen spektrographischen Untersuchungen habe ich die Angabe W. Gummelts, daß das „richtige" Spektrogramm eines Flüssigkeitsspektrums nur bei einem ganz bestimmten Verhältnis zwischen Objekt. Apparatur, Platte und Exposition zustande kommen kann, also gewissermaßen als eine Art Kompromiß zwischen diesen Faktoren zu betrachten ist, durchaus bestätigt gefunden. Es ist in der Tat nicht möglich, von beliebigen Objekten bei Innehaltung der physikalisch richtigen Versuchsbedingungen (enger Spalt, mäßige Dispersion) in jedem Falle ein Spektrogramm zu gewinnen, das von den durch die noch unzulängliche Sensibilisierungsmethode bedingten Mängeln frei ist. In gewissen Fällen muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß ein Absorptionsstreifen infolge des mehr oder weniger vollständigen Zusammentreffens mit einer photochemisch zu schwach beeinflußten Stelle der Platte (sog. Plattenminimum) eine verhältnismäßig zu große oder unrichtig verteilte Intensität aufweist, so daß bei der nachfolgenden mikrometrischen Ortsbestimmung des Absorptionsstreifens (durch Ausmessung des Negativs) ein nur annähernd richtiger Wert erhalten wird. In dieser Hinsicht bieten pathologische Objekte[3]), wie sie die Klinik liefert, oft viel größere Schwierigkeiten als physiologische oder künstliche Präparate, bei denen man im allgemeinen leichter die für ein gutes Gelingen der Spektrogramme erforderlichen Bedingungen herstellen kann. Dazu kommt, daß die pathologischen Objekte in der Zeit, die während der oft unerläßlichen Probeaufnahmen verstreicht, teilweise schon Veränderungen erleiden.

---

[1]) W. Gummelt, Zur Technik der Photographie von Absorptionsspektren. Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen **15**, 162, 1910.

[2]) l. c.

[3]) Vgl. z. B. O. Schumm, Die Absorptionserscheinungen des Hämatoporphyrinharns und seines Farbstoffes im Gitterspektrum. Mitteilungen aus den Hamburger Staatskrankenanstalten **12**, Heft 9, 199, 1911.

Bei diser Sachlage ist wohl nicht zu bezweifeln, daß man gerade in klinisch oder forensisch wichtigen Fällen zunächst eine genaue spektroskopische Untersuchung des Absorptionsbildes mit Hilfe eines Spektrometers der oben näher bezeichneten Art oder eines anderen geeigneten spektroskopischen Instrumentes ausführen muß. Hat man auf diesem Wege das fragliche Absorptionsspektrum genügend bestimmt, so sind für den sichtbaren Spektralbezirk die wichtigsten Feststellungen gewonnen, und man kann nunmehr zur spektrographischen Untersuchung übergehen. Letztere ist notwendig, wenn das absorptive Verhalten des fraglichen Objekts gegenüber dem unsichtbaren Spektrum festgestellt werden muß, z. B. bei speziellen Untersuchungen über das absorptive Verhalten von Blutfarbstoffderivaten, unter Umständen auch wohl bei der Untersuchung kleiner Blutflecke in gerichtlichen Fällen.

Will man nun verläßliche Spektrogramme herstellen, so bedarf man vor allem eines möglichst stabilen Spektrographen. Mit einem zweckmäßig konstruierten Prismenspektrographen[1]) lassen sich die Absorptionsbilder gewisser Farbstoffe leichter zur Darstellung bringen als mit dem Gitterspektrographen. Es ist aber kaum zu bezweifeln, daß die Gitterspektrographen zu allgemeinerer Anwendung kommen werden, weil sie die in vielen Fällen besonders wichtigen Absorptionserscheinungen im unsichtbaren Spektralbezirk durchweg besser zur Darstellung bringen. Wo die Mittel es gestatten, empfiehlt es sich, einen besonderen lediglich als Spektrographen dienenden Apparat aufzustellen, der jederzeit vollkommen gebrauchsfertig ist. Andernfalls bedient man sich eines Gitterspektroskops oder Gitterspektrometers, das im Bedarfsfalle durch Auswechseln des Fernrohrs gegen eine Kamera in einen Spektrographen umgewandelt werden kann. Ein derartiger, für spektrometrische und spektrographische Untersuchungen geeigneter Gitterapparat ist vor einiger Zeit vom

---

[1]) Ein konstruktiv vorzüglich durchgebildeter Prismenspektrograph ist von W. Gummelt angegeben worden. Die genaue Beschreibung findet man bei O. Schumm, Klinische Spektroskopie S. 43 bis 47. Jena 1909.

Verfasser konstruiert und genau beschrieben worden[1]). In jedem Falle muß der Apparat so stabil gebaut sein, daß seine einzelnen Teile bei geringfügigen Erschütterungen nicht vibrieren. Der zur Aufnahme des Absorptionsgefäßes dienende Objekttisch und die Kondensorlinse sind möglichst auf einer mit dem Apparat vereinigten optischen Bank anzubringen. Der Spalt des Apparates muß, falls man bei verschiedener Spaltweite arbeiten will, ein sog. symmetrischer Präzisionsspalt sein.

Hinsichtlich der Weite des Kollimatorspalts gilt das gleiche wie bei der Spektrometrie: Je enger der Spalt ist, desto genauer analysiert der Spektrograph das Lichtabsorptionsvermögen der eingeschalteten Flüssigkeit. Man wird daher in der wissenschaftlichen Spektrographie eine Spaltweite von 0,05 mm im allgemeinen nicht erheblich überschreiten und Spektrogramme, die bei wesentlich größerer Spaltweite, z. B. 0,15 bis 0,2 mm, aufgenommen sind, als Material zu genauen spektrogrammetrischen Ortsbestimmungen kaum benutzen dürfen. Bei meinen eigenen spektrographischen Untersuchungen benutze ich fast ausnahmslos Spaltweiten von 0,03 bis 0,05 mm.

Als Lichtquelle wird für die spektrographischen Aufnahmen gelegentlich auch Sonnenlicht empfohlen. Es läßt sich aber nur in einer beschränkten Anzahl von Fällen benutzen. Störend wirken nicht nur die Schwankungen in der Intensität des Lichtes, sondern auch die Veränderlichkeit seines Spektrums, die durch das zeitweise Auftreten von Gruppen atmosphärischer Linien bedingt ist. Fallen die zu photographierenden Absorptionserscheinungen mit diesen Linien zusammen, so kann die Ortsbestimmung der Absorptionsstreifen auf dem Spektrogramm stark beeinträchtigt werden. Im allgemeinen erweist sich das Licht der Nernstlampe (Zirkonlicht) oder das einer mit etwas Über-Spannung brennenden Metallfadenlampe (mit U-förmig gebogenem Metallfaden) als geeigneter. Lampe und Kondensor müssen so angeordnet werden, daß das schmale Bild des glühenden Fadens möglichst zentrisch auf den Spalt

[1]) O. Schumm, Ein neues Gitterspektroskop und ein Gitterspektrograph mit variabler Dispersion usw. Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 290 bis 294, 1910.

fällt. Der Spalt erscheint dann als Halbierende in dem ihn überdeckenden Lampenfadenbilde. Nach Einschaltung des Gefäßes mit der zu spektrographierenden Flüssigkeit überzeuge man sich, daß nicht etwa eine Ablenkung des auf den Spalt projizierten Lampenfadenbildes erfolgt ist. Als Absorptionsgefäße verwende man rechteckige Glaskästen mit ebenen parallelen Innen- und Außenwänden.

Um auf dem Spektrogramm den Ort der Absorptionsstreifen in absoluten Werten genau bestimmen zu können, muß auf die Platte ein genau bekanntes Linienspektrum photographiert werden. Dazu eignet sich sehr gut das Spektrum des Heliumgases, wie man es in den von Goetze, Leipzig, hergestellten Heliumröhren durch einen Funkeninduktor erhält. Von der Zuverlässigkeit der Heliumröhre überzeugt man sich zuvor, indem man ihr Licht mit einem Gitterspektrometer untersucht. Heliumspektrum und Absorptionsspektrum sind auf der Platte zweckmäßig so anzuordnen, daß die Heliumlinien etwas in das Absorptionsspektrum hineinreichen. Man bewirkt das durch entsprechendes Verschieben des Kassettenrahmens. Damit bei dieser notwendigen Manipulation keine seitliche Versetzung der Kassette eintreten kann, muß die Kassettenführung in präzisester Weise hergestellt sein. Das Bild des capillaren Teils der Heliumröhre muß genau mitten auf den Spalt projiziert werden, doch so, daß der Spalt von dem leuchtenden linienartigen Bilde gut überdeckt ist. Man erreicht das am zuverlässigsten dadurch, daß man die Heliumröhre ebenso wie die Nernstlampe in gerader Richtung vor dem Apparat bzw. auf der optischen Bank anbringt. Eine andere Anordnung, bei der das Licht der seitlich aufgestellten Heliumröhre durch ein Reflexionsprisma auf den Spalt gelenkt wird, hat sich mir weniger bewährt. Die genaue Ortsbestimmung der Absorptionsstreifen auf dem Spektrogramm (d. i. die Spektrogrammetrie) erfolgt unter Benutzung besonderer Meßapparate, deren Besprechung hier unterbleiben kann. Bei sorgfältig hergestellten und gut gelungenen Spektrogrammen scharfer Absorptionsstreifen ergibt diese spektrogrammetrische Ortsbestimmung recht genaue Resultate.

Quantitative Untersuchung der Toxizitätsänderung des Morphins bei Kombination mit anderen Opiumalkaloiden.

Von

Heinrich Caesar.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 19. Mai 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Von Straub[1]) ist gefunden worden, daß die Wirksamkeit des Morphins durch Narkotin gesteigert werden kann, und zwar, da das Narkotin so gut wie unwirkam ist, im Sinne einer Potenzierung. Die in praxi beobachteten Verschiedenheiten der Opiumwirkung vor der Morphinwirkung werden dadurch verständlich. Die Straubschen Messungen sind zumeist nur an einem Mischungsverhältnisse, nämlich der Kombination gleicher Molekülmengen der beiden Alkaloide angestellt. Es war nötig, noch den Verlauf dieser Wirksamkeitsänderung über den ganzen Bereich der Möglichkeiten zu verfolgen. Ich habe auf Veranlassung von Prof. Straub diese erweiterten Messungen durchgeführt. Ebenso habe ich die Veränderung der Wirksamkeit einiger Systeme (Morphin + Narkotin) durch ein drittes Alkaloid (Papaverin), also ein System dreier Opiumalkaloide studiert.

Die Versuche wurden ausschließlich an weißen Mäusen angestellt, deren Empfindlichkeit für Morphin und Morphinkombinationen im Vergleich mit anderen Tieren eine recht konstante ist. Die zu prüfenden Dosen sind als Äquivalente eines Gramm-Körpergewichts der Maus gerechnet, und nicht mehr als tödliche Mengen der Maus schlechtweg, wie in den Untersuchungen von Straub und O. Herrmann[2]). Als einwandfrei sah ich diejenigen Versuche an, in denen die Tiere spätestens 36 Stunden nach der Injektion starben. Um Kom-

[1]) W. Straub, diese Zeitschr. **41**, 419, 1912.

[2]) O. Herrmann, diese Zeitschr. **39**, 216, 1912.

plikationen durch Abkühlen zu vermeiden, waren die vergifteten Tiere während des Versuches in kleinen Holzkäfigen in Watte verpackt. Die Tiere wogen zwischen 10 und 25 g, durchschnittlich aber 20 g. Eine Orientierungsreihe habe ich angestellt, um zu ermitteln, ob bei den Mäusen wie beim Menschen das jugendliche Alter besonders morphinempfindlich ist. Es stellte sich heraus, daß die Empfindlichkeit mindestens in dem oben gegebenen Bereich von 10 bis 25 g als völlig konstant angesehen werden kann. Für Kaninchen ist ähnliches von E. Döbeli[1]) festgestellt worden.

Auf exakte Applikation der Giftlösungen mußte wegen des relativ großen Volumens dieser besonders geachtet werden, deshalb wurde die Einstichöffnung an der Rückenhaut stets mit einer kleinen serre fine verschlossen, die erst nach vollendeter Resorption abgenommen wurde. Versuche, in denen die Injektion nicht völlig quantitativ verlief, wurden verworfen.

1. Toxizität des Morphins.

Die Morphinlösung war stets eine 2,5%ige. Die Einzelheiten sind aus der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle I.

Morphintoxizität (nach sinkenden Dosen).

Nummer	Gewicht der Maus g	Morphin pro Gramm Maus mg	Tod in Stunden
1	11,65	1,3	0,75
2	19,75	1,1	0,5
3	16,9	0,6	1,75
4	18,5	0,6	1—12[2])
5	17,3	0,5	4—18
6	22,4	0,5	2
7	16,0	0,47	überlebt
8	21,0	0,47	2
9	17,8	0,40	überlebt
10	22,6	0,40	8—23
11	15,0	0,33	überlebt
12	18,0	0,35	8—18
13	20,1	0,30	überlebt
14	20,6	0,30	„

[1]) E. Döbeli, Monatshefte f. Kinderheilk. 9, 1910.

[2]) Soll heißen: wurde 1 Stunde lang beobachtet und nach 12 Stunden tot vorgefunden.

Als Mittelwert ergab sich rund

0,40 mg Morphin pro Gramm Maus

als tödliche Dosis.

Es wurde in dieser Reihe auf die Bedeutung des Alters (Gewichts) geachtet. Ich habe gefunden, daß sehr junge und sehr alte Tiere zuweilen aus der Reihe fallen, das optimale Gewicht liegt etwa zwischen 16 und 19 g.

Der gefundene Wert von 0,4 mg pro Gramm Maus stimmt — wohl zufällig — mit dem des Kaninchens überein, denn Wertheimer-Raffalovich[1]) fand für letzteres 0,4 g pro Kilogramm Körpergewicht.

2. Morphin + Narkotin.

Nunmehr wurde die Abänderung dieses Wertes bei Beimengung steigender Mengen von Narkotin bestimmt. Das Narkotin selbst kann, vgl. die Arbeit von Straub[2]), zum mindesten für die von mir verwendeten Mengen mit einer Eigentoxizität = Null in Rechnung gesetzt werden. Die Erscheinungen der Vergiftungen mit den Morphin-Narkotingemischen waren auch in meinen Versuchen der Qualität nach reine Morphinwirkungen.

Auf die tabellarische ausführliche Mitteilung aller sehr zahlreichen Messungen glaube ich verzichten zu können. Ihre Zuverlässigkeit ist etwa derselben Größenordnung wie die der Messungen am reinen Morphin. Die mitzuteilenden Toxizitätswerte sind Mittelwerte von jeweils sehr vielen Einzelbestimmungen. Bemerkenswert ist, daß die tödlichen Mengen aller Morphin-Narkotinkombinationen sehr viel rascher wirkten als die Grenzdosen des reinen Morphins. Vergiftungen, die nicht in 1 bis 2 Stunden zum Tode führten, wurden stets überstanden, während beim reinen Morphin — vgl. die Tabelle — die Erscheinungen sich viel länger hinzogen. Die Werte der Kombinationen sind also jedenfalls schärfer. Die gewiß interessante genauere Verfolgung der Wirksamkeit nach der Zeit lag nicht in meinem Plane.

Die folgende Tabelle und das Diagramm gibt das Resultat meiner gesamten Messungen an Morphin-Narkotinkombinationen.

---

[1]) R. Wertheimer-Raffalovich, Deutsch. med. Wochenschr. 1910.

[2]) l. c.

Tabelle II.

Toxizität von Morphin-Narkotinkombinationen mit steigendem Narkotingehalt.

Nummer	Lösungen	Toxizität in Milligramm Morphin pro Gramm Maus
0	2% Morphin + 0% Narkotin	0,40
1	2 „ „ + 0,2% „	0,38
2	2 „ „ + 0,4 „ „	0,31
4	2 „ „ + 0,6 „ „	0,33
5	2 „ „ + 1,0 „ „	0,40
6	2 „ „ + 1,6 „ „	0,32
7	2 „ „ + 2,0 „ „	0,23
8	2 „ „ + 2,4 „ „	0,27
9	2 „ „ + 3,0 „ „	0,32
10	2 „ „ + 4,0 „ „	0,35

Das Resultat dieser Messungen ist außerordentlich auffallend. Es ergab sich, daß mit wachsenden Beimengungen von Narkotin die Toxizität des Morphins nach einer Kurve mit 3 Wendepunkten beeinflußt wird. (Fig. 1.)

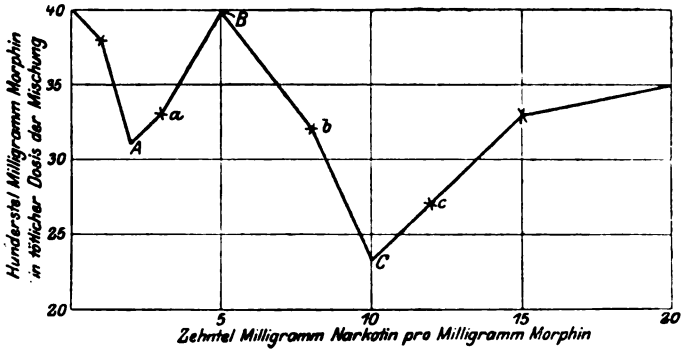


Fig. 1.

Nach der Wirksamkeitszunahme des Morphins betrachtet, liegt

das erste Optimum bei 1 Morphin + 0,2 Narkotin,

„ zweite „ „ 1 „ + 1 „

Dieses zweite ist das größere und repräsentiert eine Steigerung auf etwa die doppelte Wirksamkeit; zwischen beiden liegt ein Pessimum bei 1 Morphin + 0,5 Narkotin, bei dem die Mischung wirkt, als ob überhaupt kein Narkotin vorhanden wäre. Nach dem zweiten Optimum — dem Maximum — nimmt die Wirksamkeit abermals ab, ohne jedoch an Grad der Einbuße das

Pessimum wiederum zu erreichen, wenigstens nicht bis zu Kombinationen 1 Morphin + 2 Narkotin. Die weiteren Punkte der Kurve sind aus technischen Gründen nicht mehr zu messen.

Wegen der großen prinzipiellen Wichtigkeit des Resultates habe ich in gesonderten Versuchen die Lage der Punkte *A*, *B* und *C* (cf. Fig.) wiederholt kontrolliert, ohne daß sich dabei prinzipielle Änderungen ergeben hätten. Besonders achtete ich darauf, ob etwa das Pessimum (Punkt *B*) noch unter die Werte der reinen Morphintoxizität sinken könnte; ich konnte es nicht finden.[1]) Da aber zwischen den Punkten *a* und *b* noch ein unbekannter Meßbereich liegt, will ich eine Abnahme unter *B* nicht als unmöglich hinstellen.

Das Maximum *C* muß jedenfalls in der nächsten Nähe des Mischungsverhältnisses 1:1 liegen. Ob ein noch tieferes Maximum etwa zwischen *b* und *C* oder *C* und *c* liegt, muß offen bleiben. Absolut genommen ist das von mir gefundene Maximum niedrig, denn Straub[2]) fand eine etwa 6fache Wirksamkeitssteigerung der gleichen Mischung und O. Herrmann[3]), an der biologischen Methode gemessen, eine zwischen der 5 bis 10fachen Steigerung gelegene Zunahme.

Über das eigentliche Wesen der Wirkungspotenzierung des Morphins durch Narkotin erfahren wir aus meinen Messungen nichts, aber das dürfte doch aus dem eigenartigen Kurvenverlauf hervorgehen, daß zur Erzielung des Effektes mindestens zwei verschiedene Elementarvorgänge nötig sind, die nach verschiedenen Gesetzen verlaufend sich summieren oder schwächen können.

3. Morphin und Papaverin.

Die Frage nach der Wirksamkeitssteigerung einer Substanz durch eine andere ist klar und eindeutig experimentell zu lösen, wenn die andere praktisch unwirksam ist; das ist beim Narkotin der Fall. Sie wird aber kompliziert, wenn die andere Substanz eine Eigentoxizität besitzt, die der der Grundsubstanz

[1]) Wie mir Prof. Straub mitteilte, ist vor mir an einem ganz anderen Mäusestamm ein Pessimum gefunden worden, das zwar nicht genau gemessen wurde, aber jedenfalls nicht unter den Werten des reinen Morphins lag. (Unveröffentlichte Versuche von Dr. O. Herrmann.)

[2]) l. c.

[3]) l. c.

nahe kommt; undiskutierbar nach der Prinzipienseite muß sie werden, wenn die zweite Substanz einen anderen Angriffspunkt hat, denn dann ist mit unkontrollierbaren Störungen des Organismus zu rechnen. Wenn die eine Substanz z. B. das Atemzentrum und die andere das Herz halbtödlich schädigt, so kann mittelbar der ganze Organismus zugrunde gehen, ohne eine dazu ausreichende Primärschädigung.

Beim Papaverin ist nun leider beides der Fall. Seine Toxizität bestimmte ich an verschieden konzentrierten Lösungen zu 0,16 mg pro Gramm Maus. Sie ist also $2^1/_2$mal so groß, wie die des reinen Morphins. Der Angriffspunkt der Papaverinwirkung im Organismus muß sicher ein anderer sein wie der des Morphins, denn bei tödlichen Dosen sterben die Tiere unter Krämpfen, und bei Vergiftungen, die eben noch überstanden werden, zeigt sich keine Beeinflussung der Atmung, die nur entfernt der durch Morphin erzielbaren nahe käme.

Es wird also, wie auch die Kombinationen sich in ihrer Toxizität verhalten mögen, eine Wirksamkeitssteigerung im Sinne einer reinen Potenzierung nur mit großen Einschränkungen gefolgert werden dürfen, am ehesten noch dann, wenn die Papaverindosis vergleichsweise sehr klein ist.

Wegen der Besonderheit der hier waltenden Verhältnisse habe ich in der Berechnung der Toxizität der Gemische die Eigentoxizität der Komponenten mit berücksichtigen müssen, d. h. ich habe die in der gefundenen tödlichen Dosis eines untersuchten Systems enthaltenen absoluten Mengen der Komponenten als Bruchteile der tödlichen Dosis der reinen Substanz ausgedrückt. Beträgt die Summe der Brüche 1, so kann auf keinen Fall Potenzierung vorliegen, die nur anzunehmen ist, wenn die Summe wesentlich kleiner als 1 ist, und als Potenzierung der Morphinwirkung nur anzunehmen ist, wenn der Papaverinsummand auffallend klein ist (s. o.).

So wurde gefunden, daß bei einer Mischung von Morphin und Papaverin zu gleichen Teilen, und zwar einer Lösung, die 2% Morphin und 2% Papaverin enthielt, die tödliche Menge 0,12 mg Morphin und 0,12 mg Papaverin pro Gramm Maus enthielt, die tödlichen Mengen der beiden Alkaloide allein sind aber 0,4 bzw. 0,16 mg pro Gramm Maus, es wirkten also zusammen 12/40 letale Morphindosen (L_M) und 12/16 letale Papa-

verindosen (L_P) = 1,05 Gesamtletaldosen. Ich gebe die Resultate aller meiner Versuche tabellarisch.

Nr.	Mischungsverhältnis	$\Sigma(L_M + L_P)$	Wert
1	1 Morphin + 1 Papaverin	12/40 + 12/16	1,05
2	1 „ + 0,5 „	17/40 + 8/16	0,92
3	1 „ + 0,2 „	20/40 + 4/16	0,75

Das Resultat ist also, daß eine über die einfache Addition hinausgehende Wirksamkeitssteigerung beim Wert Nr. 3 vorhanden ist. Aus den oben gegebenen Gründen (besonders wegen der Verschiedenheiten der Angriffspunkte der beiden Alkaloide im Organismus) halte ich mich noch nicht für berechtigt, diese geringe Wirksamkeitssteigerung von 25% als eine echte Potenzierung anzusprechen. Hier müssen weitere Versuche aufklären. Keinesfalls ist das von mir gefundene Maximum — das aber natürlich noch nicht das absolute zu sein braucht — zu vergleichen mit dem bei der Kombination Morphin-Narkotin, wo ja eine Steigerung aufs vielfache vorhanden ist.

System Morphin + Narkotin + Papaverin.

In diesem System stößt man auf eine Reihe technischer Schwierigkeiten, die die untersuchbaren Kombinationen an Zahl einengen. Die Lösungen bleiben nicht beständig, trüben sich durch Ausfallen fester Niederschläge und müssen z. T. warm injiziert werden. Ich habe deshalb nur 2 Kombinationen dieses Dreiersystems untersucht und das Arbeiten mit einem anderen (Narzeïnhaltigen) Dreiersystem ganz aufgeben müssen. Es spielen hier zu viele physikalisch-chemische Besonderheiten und Unklarheiten mit herein.

1. System: 1,0 Morphin + 0,2 Narkotin + 0,1 Papaverin.

Die tödliche Grenzdosis bestand aus 0,26 mg Morphin + 0,05 Narkotin = 0,026 Papaverin. Der Toxizitätswert für den Teilsummanden (1,0 Morphin + 0,2 Narkotin) ist früher schon bestimmt worden, er beträgt 0,31 mg Morphin pro Gramm Maus. Unter Benutzung der oben entwickelten Formulierung ergibt sich also für das ganze System

$$26/31\ L_{(M+0{,}2\,Nark)} + 26/160\ L_P = 1{,}0.$$

Also hat das Papaverin keine Steigerung über die Toxizität des Systems Morphin + Narkotin hinaus zuwege gebracht.

2. System: 1,0 Morphin + 0,5 Narkotin + 0,1 Papaverin.

Die letale Dosis dieses Systems enthielt (in 19 Versuchen ermittelt) 0,16 mg Morphin + 0,08 mg Narkotin + 0,016 Papaverin. Der Teilsummand (1 Morphin + 0,5 Narkotin) ist das Pessimum der möglichen Kombinationen (s. o.), seine Toxizität 0,40 mg pro Gramm Maus für das ganze System ergibt sich somit

$$16/40\ L_{(M+0{,}5\ Nark)} + 16/160\ L_P = 0{,}5,$$

d. h. in diesem System ist eine recht beträchtliche Wirksamkeitszunahme von 100% erzielt worden.

Weitere Systeme habe ich nicht untersucht.

Das Opiumproblem.

Die mitgeteilten Untersuchungen sollen zugleich ein Beitrag zum Opiumproblem sein, d. h. zur Erklärung der Zusammenwirkung der zahlreichen Alkaloide zu einer einzigen Wirkung. Sie sind es in kritischer Hinsicht geworden. Es hat sich herausgestellt, daß die stärkste Wirkungspotenzierung des Morphins sich beim Narkotin zeigte, daß aber in Dreiersystemen abermalige und nicht vorauszusehende Wirksamkeitssteigerungen auftreten können. Es ist deshalb sicher, daß die Potenzierung der Morphinwirkung durch Narkotin nicht die letzte Lösung des Opiumeffektes (s. bei Straub, l. c.) bietet. Dafür spricht ja auch die Toxizitätsbestimmung von Opium und dessen galenischen usw. Präparaten, denn Straub fand die Toxizität des Opiumextraktes Merck mit 1,5% Narkotin bei 20% Morphin ebenso groß wie die des Narkophins (1 Morphin + 1 Narkotin). Nach meiner Tabelle ist durch eine so geringe Narkotinbeimengung noch keine nennenswerte Morphinpotenzierung zu erzielen, die beobachtete muß also auf Rechnung der Nebenalkaloide gesetzt werden, und kann es werden, denn wie festgestellt, kann schon in einem Dreiersystem mit Papaverin eine abermalige Potenzierung vorkommen.

Es ist praktisch ausgeschlossen, die optimale Zusammenmischung aller Opiumalkaloide rationell aufzufinden, und theoretisch unmöglich, sie etwa auf rechnerischem Wege zu er-

mitteln, da doch schon im einfachsten System Morphin + Narkotin zwei Grundvorgänge miteinander interferieren.

Die Zusammensetzung des Opiums ist eine stets inkonstante [Brühl[1]) notiert z. B. für Narkotin 0,75 bis 9 %!], die der galenischen usw. Opiumpräparate erst recht, man wird also bei Opium und Opiumpräparaten immer mit Inkonstanz der Wirkung schon allein im quantitativen Sinne zu rechnen haben. Andererseits ist aber das Optimum des Opiumeffektes nach Straubs und meinen Untersuchungen schon durch eine sehr einfache Kombination von Morphin und Narkotin zu gleichen Teilen erzielbar, so daß mir in der Tat die einfachste und zurzeit beste Lösung des Problems jenes Mischungsverhältnis der beiden Alkaloide zu sein scheint, um so mehr als es sich in der Gestalt des gemischtes Salzes von je einem Mol der beiden Alkaloide mit der im Opium vorhandenen Mekonsäure als einheitliches chemisches Molekül darstellen läßt.

Nachtrag bei der Korrektur.

Auf die inzwischen erschienene Arbeit von B. v. Issekütz: Über den Synergismus der Opiumalkaloide: Arch. f. d. ges. Physiol. **145**, 415, 1912 kann ich nicht mehr eingehen. Ich entnehme ihr indessen, daß die wichtigsten Feststellungen von Straub und mir nach dem Verfasser auch an Fröschen zu Recht bestehen.

[1]) Pflanzenalkaloide, 1900.

Zur Kenntnis der gegenseitigen Abhängigkeit zwischen Eiweißabbau und Atmung der Pflanzen.

II.

Über die Wirkung der Kohlenhydrate, der Phosphate und der Oxydationsmittel auf die Bildung und die Assimilation des Ammoniaks in abgetöteten Pflanzen.

Von

W. Palladin und **N. Iwanoff.**

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 20. Mai 1912.)

Mit 3 Figuren im Text.

Der im Gebiete der Tierphysiologie mit so großem Erfolge erforschte Prozeß der Bildung und des Verbrauchs des Ammoniaks hat bis in die letzte Zeit hinein die Aufmerksamkeit der Botaniker nur wenig auf sich zu richten vermocht.

Und doch verdient dieser Vorgang ganz besondere Beachtung, da er nicht nur mit den Prozessen des Abbaues und der Synthese der Eiweißstoffe, sondern auch mit denen der Gärung und der Atmung in engstem Zusammenhange steht, wie dies z. B. aus den Untersuchungen von Ehrlich zu ersehen ist. E. Schulze[1]) hat als erster nachgewiesen, daß während des Keimens der Samen Ammoniak gebildet wird. Die von Castoro[2]), Zaleski[3]), Butkewitsch[4]) und Kiesel[5]) über die Autolyse verschiedener Pflanzen angestellten Versuche haben ergeben, daß die Bildung des Ammoniaks einen fermentativen Prozeß darstellt. Außerdem haben Gulewitsch[6]) und Schwarzschild[7]) nachgewiesen, daß der Desaminierungsprozeß durch ein besonderes Ferment hervor-

[1]) E. Schulze, Landw. Jahrb. **35**.
[2]) N. Castoro, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 525, 1907.
[3]) W. Zaleski, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **25**, 356, 1907.
[4]) Wl. Butkewitsch, diese Zeitschr. **16**, 448, 1909.
[5]) A. Kiesel, Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**, 453, 1909.
[6]) Gulewitsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**.
[7]) Schwarzchild, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**.

gerufen wird und mit Hilfe eines proteolytischen Ferments nicht ausgeführt werden kann. Pringsheim[1]) hat diesem Ferment den Namen Desamidase gegeben. Es ist wohl möglich, daß ein unbedeutender Teil des Ammoniaks unmittelbar bei der Autolyse der Eiweißstoffe gebildet wird, die Hauptmasse aber des in den Pflanzen auftretenden Ammoniaks wird aus den primären Zerfallsprodukten der Eiweißstoffe gebildet, wie dies aus den nachstehend angeführten Arbeiten hervorgeht. Shibata[2]) beobachtete die Desaminierung von Harnstoff und Hippursäure mit Hilfe von zerriebenen oder durch Aceton abgetöteten Mycelien von Aspergillus niger. Shiga[3]) desaminierte Arginin mit Hefepreßsaft. Takeuchi[4]) beobachtete die Desaminierung bei höheren Pflanzen. Kiesel desaminierte durch Autolyse Arginin[5]) und Asparagin[6]), ferner durch verschiedene abgetötete Pflanzen Arginin und Harnstoff[7]). Saure Reaktionen begünstigen eine Anhäufung von Ammoniak bei lebenden Pflanzen, alkalische Reaktionen halten die Bildung desselben auf. So fand Butkewitsch[8]), daß Aspergillus niger in Kulturen auf Pepton hauptsächlich Ammoniak bildet, während Penicillium glaucum umgekehrt hauptsächlich Tyrosin und Leucin bildet. Dieser Unterschied steht in Abhängigkeit von der Reaktion des Nährsubstrates. So bildet Aspergillus beträchtliche Mengen von Oxalsäure, so daß das Nährsubstrat sauer wird, während Penicillium keine Oxalsäure bildet und sein Nährsubstrat infolge der Bildung von Ammoniak bald alkalisch wird. Kultiviert man dagegen Aspergillus bei Überschuß von kohlensaurem Calcium, so kommt es meist zu einer Bildung von Ammoniak und in dem Nährsubstrat findet eine Anhäufung von Tyrosin und Leucin statt. Ebenso kann man auch Penicillium dazu bringen, Leucin und Tyrosin zu desaminieren, indem man das Nährsubstrat durch Hinzufügen von Phosphorsäure sauer macht. Auf Grund der vorliegenden Arbeiten wird man den Desaminierungsprozeß in Pflanzen für einen in beträchtlichem Grade oxydierenden Prozeß ansehen müssen. Besondere Beachtung verdienen die Versuche von Godlewski[9]), der nur sehr geringe Mengen von Ammoniak unter den Zerfallsprodukten der Eiweißstoffe in ihres Sauerstoffs beraubten Samen gefunden hat. Bei den Versuchen von Butkewitsch[10]) wurde Pepton durch Aspergillus niger nur bei Zutritt von Luft bis zu Ammoniak abgebaut; bei ungenügendem Sauerstoffzutritt hingegen er-

[1]) Pringsheim, diese Zeitschr. **12**, 15, 1908.

[2]) K. Shibata, Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol. **5**, 384, 1904.

[3]) K. Shiga, Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**, 502, 1904.

[4]) T. Takeuchi, Journ. of Coll. Agr. Tokyo I, **1909**, Nr. 1.

[5]) A. Kiesel, Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**, 460, 1909; **75**, 169, 1911.

[6]) A. Kiesel, l. c. **60**, 476, 1909.

[7]) A. Kiesel, l. c. **75**, 169, 1911.

[8]) Wl. Butkewitsch, Jahrb. f. wissensch. Botanik **38**, 147, 1903.

[9]) Godlewski, Bulletin de l'Académie de Cracovie. Classe de sc. mathém. Série B, octobre 1911.

[10]) Wl. Butkewitsch, Jahrb. f. wiss. Botanik **38**, 147, 1903.

folgte der Zerfall nur bis zu Aminosäuren. Später fand Butkewitsch[1]), daß Ammoniak in großen Mengen in anästhesierten Pflanzen gebildet wird, bei denen die Energie der Atmung und folglich auch die Aufnahme von Sauerstoff bekanntlich erhöht wird. Eine Erhöhung erfährt auch der Zerfall der Eiweißstoffe[2]) und daher wahrscheinlich auch die anderen analytischen Reaktionen, zuungunsten der synthetischen. Eine sehr intensive Bildung von Ammoniak erhielt Kiesel[3]) bei der Autolyse von Saft aus alten Stengeln von Vicia Faba, die bei sehr schwachem Lichte gewachsen waren und das Aussehen etiolierter Pflanzen hatten. Ungeachtet dessen, daß nur 2,3% (von der allgemeinen Menge Stickstoffs) Eiweißstickstoff verloren ging, kamen doch 11,2% Ammoniakstickstoffs hinzu. Der Ammoniak wurde demnach durch Desaminierung der in großer Menge in dem Safte enthalten gewesenen Zerfallsprodukte von Eiweißstoffen gebildet. Obgleich der Verfasser sich nicht dafür auszusprechen wagt, daß die Desaminierung im gegebenen Falle einen Oxydationsprozeß darstellt, so erscheint dieses doch im höchsten Grade wahrscheinlich. Schon während der Zubereitung des Saftes hatte dieser infolge der Oxydierung des Atmungschromogens eine intensiv violette Färbung angenommen. Die Aufnahme von Sauerstoff dauerte auch noch während der Autolyse an.

Prianischnikoff[4]) hält die Desaminierung für einen Oxydationsprozeß. In den Pflanzen weisen die Oxydationsprozesse im allgemeinen einen schwächeren Charakter auf, als in den Tieren. Aus diesem Grunde ist die Methylierung der Zerfallsprodukte der Eiweißstoffe bei den höheren Pflanzen, im Vergleiche zu den Tieren, stärker verbreitet[5]). Nach Ackermann und Kutscher[6]) kann die Methylierung im gegebenen Falle als ein vorbereitender Prozeß behufs leichterer späterer Oxydation betrachtet werden.

Indem ich mich der Auffassung von Euler[7]) anschließe, wonach die synthetischen und analytischen Prozesse in den Pflanzen wie auch in den Tieren an verschiedenen Orten vor sich gehen müssen, namentlich wenn sie bei verschiedenen Reaktionen des Mediums stattfinden, vermute ich, daß wir auf Grund der hier dargelegten Untersuchungen annehmen müssen, daß die Desaminierung der stickstoffhaltigen Zerfallsprodukte von Eiweißstoffen bei den höheren Pflanzen hauptsächlich innerhalb der Vakuolen in den Zellen der im Wachstum begriffenen (und der etwas älteren) Zone des Stengels vor sicht geht. In diesen Teilen des

[1]) Wl. Butkewitsch, diese Zeitschr. **16**, 411, 1909.

[2]) W. Zaleski, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **18**, 292, 1900.

[3]) A. Kiesel, Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**, 453, 1909.

[4]) Prianischnikoff, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **1910**, 253.

[5]) R. Engeland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**, 2968, 1909; Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 403, 1910. — E. Schulze und G. Trier, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 46, 59, 1910.

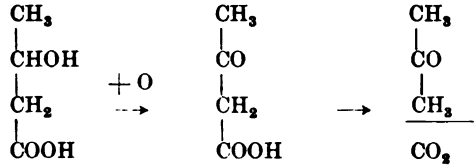
[6]) D. Ackermann und Fr. Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 271, 1910.

[7]) H. Euler, Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie. 2. und 3. Teil, 1909, S. 202, 235.

Stengels erfolgt nach Palladin[1]) die Assimilation des Sauerstoffs, während die Vakuolen mit einem nach Butkewitsch für die Desaminierung erforderlichen sauren Safte angefüllt sind. Das Sonnenlicht vermag auf Grund der Versuche von Neuberg[2]) den Desaminierungsprozeß zu begünstigen. Aller Wahrscheinlichkeit nach geht an diesen selben Stellen des Stengels gleichzeitig auch die Bildung von Asparagin oder (bei Caryophyllaceen) von Glutamin vor sich, da die Bildung von Ammoniak von einem Verbrauch desselben begleitet ist[3]).

Es liegen Untersuchungen vor, die zeigen, daß eine Bildung von Ammoniak auch ohne die Teilnahme des Sauerstoffs der Luft vor sich gehen kann [Reduktion und Hydratation[4])]. Schittenhelm[5]) fand, daß ein und dasselbe Ferment sowohl bei Zutritt von Sauerstoff, wie auch bei Abwesenheit desselben tätig sein kann. Er schied aus der Milz ein Ferment aus, das Guanin ($C_5H_5N_5O$) ohne Teilnahme von Sauerstoff in Xanthin ($C_5H_4N_4O_2$) und bei Teilnahme von Sauerstoff in Harnsäure ($C_5H_4N_4O_3$) verwandelt. Butkewitsch[6]) vermutet, daß die Desaminierung auf verschiedene Weise vor sich gehen kann: die Aminosäuren bauen sich unter Oxydation ab, die Amyde durch Hydratation.

Die Untersuchungen über die Bildung von Ammoniak in Pflanzen aus den Abbauprodukten der Eiweißstoffe ermöglichen es nicht, über den Chemismus dieses Prozesses zu urteilen. Um diesen Chemismus klarzulegen, untersuchten die einen Autoren den Abbau der Aminosäuren durch chemische Reaktionen, andere dagegen untersuchten den Abbau der Aminosäuren von bestimmter Struktur mit Hilfe von Pflanzen. Zu der ersteren Kategorie gehören die Untersuchungen von Neuberg und Dakin. Bei Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Ferrosulfat auf Leucin entstanden Isovaleraldehyd, Isovaleriansäure, Ammoniak, Kohlensäure und geringe Mengen von Aceton[7]), das das Ergebnis einer weiteren Oxydation von Ketonsäuren darstellt[8]):



β-Oxybuttersäure — Acetessigsäure — Aceton

[1]) W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **1886**.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **13**, 305, 1908; **29**, 279, 1910.

[3]) F. Knoop, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 489, 1910. — A. Medwedew, Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**, 410, 1911.

[4]) E. Abderhalden, Biochem. Handlexikon **4**, 360, 1911.

[5]) A. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 235, 1904 bis 1905.

[6]) Wl. Butkewitsch, diese Zeitschr. **16**, 452, 1909.

[7]) H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. **4**, 65, 1908.

[8]) H. D. Dakin, l. c., S. 77. Auch G. Lusk, Ernährung und Stoffwechsel. Wiesbaden 1910, S. 263.

Auch bei der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Eiweißstoffe in Gegenwart eines mineralischen Katalysators hatten Neuberg und Blumenthal[1]) Isovaleraldehyd und Aceton erhalten. Orgler[2]) gewann Aceton aus Hühnereiweiß. Später wiesen Neuberg und Miura[3]) nach, daß der Stickstoff bei derartigen Reaktionen in Gestalt von Ammoniak frei wird. Auch für die Bildung von Ketosäuren fand Neuberg[4]) Anzeichen bei der Oxydation von Aminosäuren mit H_2O_2. Dieselben Vorgänge, Desaminierung, Ketosäurebildung und Abbau treten nach Neuberg[5]) bei den photokatalytischen Umwandlungen der Aminosäuren und Proteine ein, ebenso bei Elektrolyse[6]) derselben. Durch alle diese Versuche ist demnach gezeigt worden, daß der Abbau der Aminosäuren von einer Bildung von Ammoniak, Kohlensäure, sowie von Ketosäuren begleitet wird. Zu den gleichen Ergebnissen führten auch Untersuchungen über Abbau von Aminosäuren mit Hilfe von Pflanzen. Bei den Fäulnisversuchen, die mit isolierten Aminosäuren angestellt sind, hat C. Neuberg[7]) mit Sicherheit die Desaminierung festgestellt. Hier handelt es sich um Reduktionsvorgänge, die sicher eine gewisse Analogie zu pflanzenphysiologischen Prozessen gestatten, z. B. zur Methylierung (durch Reduktion). Abgesehen von Versuchen mit Bakterien[8]) verdienen die Untersuchungen von F. Ehrlich[9]) über die alkoholische Gärung von Aminosäuren Beachtung. Die Hefe besitzt die Fähigkeit, Leucin und ähnliche Aminosäuren in Alkohol, Kohlensäure und Ammoniak zu spalten:

$$R.CH(NH_2).CO_2H + H_2O = R.CH_2OH + CO_2 + NH_3.$$

Aus Leucin erhält man unter anderem Amylalkohol. Nach den Untersuchungen von O. Neubauer[10]) treten bei diesen Gärungen von Aminosäuren ebenfalls die entsprechenden Ketosäuren als Zwischenprodukte auf. Die Reaktion zerfällt in zwei Teile:

---

[1]) C. Neuberg und F. Blumenthal, Deutsche med. Wochenschr. **1901**, Nr. 1. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 238, 1902.

[2]) A. Orgler, Beiträge z. chem. Pysiol. und Pathol. **1**, 583, 1902.

[3]) C. Neuberg und S. Miura, diese Zeitschr. **36**, 37, 1911.

[4]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **20**, 531, 1909.

[5]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **13**, 305, 1908; **29**, 279, 1910.

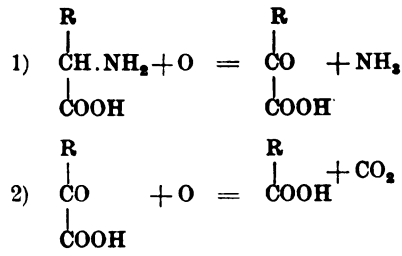
[6]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **17**, 270, 1909. — Neuberg, Scott und Lachmann, diese Zeitschr. **24**, 152, 1910.

[7]) W. Brasch und C. Neuberg, diese Zeitschr. **18**, 299, 1908. — C. Neuberg und C. Cappezuoli, l. c. **18**, 424, 1909. — C. Neuberg, l. c., S. 431.

[8]) O. Neubauer, in Abderhalden, Biochem. Handlexikon **4**, 360, 1911.

[9]) F. Ehrlich, diese Zeitschr. **2**, 52, 1906; **18**, 391, 1909. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 1027, 1907; **44**, 139, 1911; Sammlung chem. u. chem.-techn. Vorträge **17**, 1911.

[10]) O. Neubauer und K. Fromherz, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 326, 1910/1911.



Als Endprodukte des Zerfalls der Aminosäuren können auch Oxysäuren auftreten[1]).

Es ist beachtenswert, daß bei der Vergärung von Leucin durch lebende Hefe in vergorenen Lösungen kein Ammoniak nachgewiesen werden kann. Letzteres wird demnach auf die Bildung von Eiweißstoffen verwendet[2]). Als Bestätigung für diesen Umstand kann die Tatsache dienen, daß durch Hinzufügung von Ammoniaksalzen zu den gärenden Maischen ein Aufhören der Fuselölbildung hervorgerufen wird, was wiederum auf ein Aufhören des Abbaues der Aminosäuren hinweist[3]). Knoop[4]) erhielt nach der Fütterung von Hunden mit β-Benzylbrenztraubensäure ($C_6H_5.CH_2.CH_2.CO.COOH$) in deren Harn die entsprechende Phenylaminobuttersäure ($C_6H_5.CH_2.CH_2.CH(NH_2).COOH$). G. Emden[5]) und seine Mitarbeiter erhielten bei der künstlichen Durchströmung der Hundeleber unter Zusatz der Ammoniaksalze verschiedener α-Ketosäuren die entsprechenden Aminosäuren. Solche Versuche weisen ebenfalls darauf hin, daß das sich infolge der Desaminierung bildende Ammoniak von neuem für die Bildung von Aminosäuren verwendet wird, d. h. eines zur Synthese der Eiweißstoffe dienenden Materials.

Da die Desaminierung nicht nur allein von dem Abbau des Ammoniaks, sondern auch von Kohlensäureausscheidung begleitet wird, so folgt hieraus, daß die bei der alkoholischen Gärung und bei der Atmung ausgeschiedene Kohlensäure nicht ausschließlich auf Kosten der Glucose gebildet wird: ein Teil derselben bildet sich auf Kosten der Aminosäuren[6]). Wie groß kann nun die Menge

---

[1]) F. Ehrlich und K. A. Jacobsen, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 888, 1911.

[2]) F. Ehrlich, diese Zeitschr. **86**, 477, 1911.

[3]) F. Ehrlich, Über die Bedeutung des Eiweißstoffwechsels usw. S. 7.

[4]) F. Knoop, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 489, 1910.

[5]) G. Embden und E. Schmitz, diese Zeitschr. **29**, 423, 1910; **38**, 393, 1912. — K. Kondo, l. c. S. 407. — H. Fellner, l. c. S. 414.

[6]) Die Bildung von CO_2 ist bei der alkoholischen Gärung der Aminosäuren experimentell so wenig wie die NH_3-Entstehung nachweisbar. Sie kann auch als Ameisensäure auftreten oder mit NH_3 als Carbaminsäure $NH_2.COOH$ oder Tiocyansäure zur Eiweißsynthese dienen. C. Neuberg.

der aus den Aminosäuren erhaltenen Kohlensäure sein? Es sind hier zwei Fälle zu unterscheiden: die Atmung lebender und die Atmung abgetöteter Pflanzen. Die Atmung abgetöteter Pflanzen wird von einem starken Zerfall der Eiweißstoffe unter Bildung von Aminosäuren begleitet. Es ist also in diesem Falle eine mehr oder weniger starke Ausscheidung von Kohlensäure aus den Aminosäuren möglich. Besonders wahrscheinlich erscheint die Bildung von Kohlensäure auf Kosten der Aminosäuren bei der Bearbeitung von Produkten der Autolyse von Pflanzen oder von Produkten der alkoholischen Gärung mit Peroxydase und Wasserstoffsuperoxyd; noch wahrscheinlicher erscheint eine solche Entstehung von Kohlensäure bei der Bearbeitung der erwähnten Produkte mit Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von schwefelsaurem Eisenoxydul[1]). Was dagegen lebende Pflanzen betrifft, so erscheint die Frage verwickelter. Obgleich eine Autolyse der Eiweißstoffe auch in lebenden Organen[2]) stattfindet und eine Desaminierung unter Bildung von Fuselölen, wie F. Ehrlich dies nachgewiesen hat, von lebender Hefe herbeigeführt wird, so sind doch in lebenden Pflanzen gleichzeitig auch Bedingungen enthalten, die den Zerfall der Eiweißstoffe aufhalten[3]).

Unsere Versuche verfolgen den Zweck, die bei der Bildung und dem Verbrauche des Ammoniaks in abgetöteten Pflanzen obwaltenden Bedingungen festzustellen, wie auch den Zusammenhang dieser Vorgänge mit den Prozessen der alkoholischen Gärung und der Atmung. Aus diesem Grunde waren wir bestrebt, die Abhängigkeit der Bildung und des Verbrauches des Ammoniaks während der Autolyse sowohl von oxydierenden Reaktionen wie auch von Kohlenhydraten und Phosphaten festzustellen.

In dem ersten Teile unserer Versuche, die den Charakter von Vorversuchen trugen, bestimmten wir das Ammoniak durch Destillation bei 100° unter Zusatz von MgO. Diese Methode ist für die Bestimmung des Ammoniaks in lebenden Samenpflanzen, die Amide und Säureamide enthalten, nicht anwendbar, sie gibt aber verhältnismäßig befriedigende Resultate bei vergleichenden Untersuchungen von Produkten der Autolyse, wo kein Asparagin und kein Glutamin mehr erhalten wird. Hierauf gingen wir zu der Bestimmung des Ammoniaks bei einem Druck von 8 bis 15 mm und einer Temperatur von 40 bis 43° über,

---

[1]) S. Kostytschew, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 116, 1910.

[2]) M. Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 172, 1900.

[3]) L. Iwanoff, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43, 464, 1904 bis 1905.

unter Zusatz von NaCl, Na_2CO_3 und Äthylalkohol[1]). Statt einer Peligotschen Röhre benutzten wir als Rezipient einen Kolben mit rundem Boden[2]). In einigen Fällen wurden die Eiweißstoffe zuvor mit Citronensäure und Pikrinsäure entfernt. Die quantitative Bestimmung der Eiweißstoffe wurde nach der Stutzerschen Methode ausgeführt. In einigen Fällen wurde nach der Abtrennung der Eiweißstoffe durch Kupferoxydhydrat Bleiessig zum Fällen der Peptone hinzugefügt. In dem erhaltenen Filtrate wurden die Diaminosäuren durch Phosphorwolframsäure gefällt. Der Stickstoff im Niederschlag von Kupferoxydhydrat, Bleiessig und Phosphorwolframsäure wurde nach Kjeldahl bestimmt.

Versuch 1.

18 Portionen glykogenarmen Zymins je 2,3 g in 50 ccm Flüssigkeit. Autolyse mit Toluol bei 18 bis 19°, 12 Portionen im Laufe von 8 Tagen und 6 Portionen im Verlaufe von 10 Tagen. Zur Bestimmung des zum Anfange des Versuches vorhandenen Ammoniakstickstoffes wurden 2 Portionen Zymin zu je 6 g genommen. 1. 1,653 mg N, 2. 1,52 mg N. In 2,3 g Zymin sind demnach im Mittel 0,6 mg Ammoniakstickstoff enthalten. In der Tabelle sind die mittleren Zahlen nach Abzug des Ammoniakstickstoffes gegeben, der am Anfange des Versuches vorhanden war. Destillation bei 100°.

Medium	Ammoniak-N					
	nach 8 Tagen			nach 10 Tagen		während der 2 letzten Tage
	mg		%	mg	%	
Wasser 50 ccm	8,41 9,37	8,2	100,0	13,4	163,4	+ 63,4 (63 %)
Wasser + 1 g KH_2PO_4	1,38 2,34	1,2	14,6	2,1	25,6	+ 11,0 (75 %)
Wasser + 1 g K_2HPO_4	6,34	5,7	70,0	6,8	83,0	+ 13,0 (18 %)
Glucose 5 g	2,75 2,75	2,1	25,6	2,4	29,2	+ 3,6 (14 %)
Glucose 5 g + KH_2PO_4 1 g	1,38 1,92	1,0	12,1	1,8	22,0	+ 9,8 (80 %)
Glucose 5 g + K_2HPO_4 1 g	4,13 3,86	3,4	41,4	4,0	48,8	+ 7,4 (18 %)

[1]) M. Krüger und O. Reich, Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 165, 1903. — A. Medwedew, l. c. **72**, 410, 1911.

[2]) A. Steyer, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 314, 1902. — Abderhalden, Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden **3**, 765, 1910.

Die Ergebnisse des Versuches sind durch nachstehende Kurve angegeben (Fig. 1).

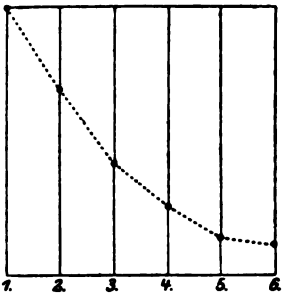


Fig. 1. Bildung des Ammoniaks bei der Autolyse des Zymins: *1.* Wasser, *2.* Wasser mit K_2HPO_4, *3.* Glucose mit K_2HPO_4, *4.* Glucose, *5.* Wasser mit KH_2PO_4, *6.* Glucose mit KH_2PO_4.

Versuch 2.

16 Portionen Hefanol, je 6 g in 100 ccm Flüssigkeit. Gesamtstickstoff in 6 g 540,6 mg.

A. Autolyse während 67 Stunden bei 52 bis 54°. In 4 Portionen wurde nach der Autolyse die Menge des Eiweiß-N bestimmt, das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt und im Niederschlage die Stickstoffmenge bestimmt (Peptone, organische Basen und Ammoniak). Destillation bei 100°.

Medium	Menge des N					
	zerfallener Eiweißstoffe		im Niederschlag von Phosphorwolframsäure		Ammoniak	
	mg	% des Ges.-N	mg	% des Ges.-N	mg	% des Ges.-N
Wasser	271,9	50,3	131,1	24,2	15,9	2,9
KH_2PO_4 1 g	298,7	55,2	163,2	30,2	14,5	2,7
Glucose 5 g	264,1	48,8	156,8	29,0	14,2	2,6
Glucose 5 g + KH_2PO_4 1 g	284,4	52,6	166,3	30,7	10,0	1,8

B. Autolyse während 8 Tagen bei 18 bis 19°.

Medium	Ammoniak-N	
	mg	% des Ges.-N
Wasser	32,78	6,0
KH_2PO_4 1 g	30,55	5,6
Glucose 5 g	25,25	4,6
Glucose 5 g + KH_2PO_4 1 g	11,58	2,1

C. Autolyse während 14 Tagen bei 18 bis 19°. In 4 Portionen wurde die Menge der zerfallenen Eiweißstoffe bestimmt, im Filtrate der Stickstoff im Niederschlag durch Bleiessig (Peptone) und im neuen Filtrate der Stickstoff im Niederschlag durch Phosphorwolframsäure (organische Basen und Ammoniak). Bei der Berechnung der Menge des Ammoniakstickstoffs (Serie B) aus letzteren Zahlen ergibt sich der Stickstoff der Diaminosäuren.

Medium	Menge des N						
	zerfallener Eiweißstoffe		Peptone		Diaminosäuren u. Ammoniak		Diaminosäuren in % des Ges.-N
	mg	% des Ges.-N	mg	% des Ges.-N	mg	% des Ges.-N	
Wasser . . .	255,4	47,2	18,38	3,3	36,2	6,7	0,7
KH_2PO_4 1 g .	280,6	51,9	40,84	7,5	—	—	—
Glucose 5 g . .	—	—	18,52	3,7	68,82	12,4	7,8
Glucose 5 g + KH_2PO_4 1 g	269,0	49,7	36,98	6,9	66,38	12,2	10,1

Addiert man den Stickstoff der Peptone mit dem Stickstoff der organischen Basen und des Ammoniaks, so erhält man:

	mg	% des Ges.-N	Bei einer Temp. von 52 bis 54° mehr
Wasser	54,58	10,0	+ 14,2%
Glucose	87,34	16,1	+ 12.9%
Glucose + KH_2PO_4 . . .	103,36	19,1	+ 11,6%

Obgleich daher bei Zimmertemperatur fast ebenso viele durch Kupferoxydhydrat fällbare Eiweißstoffe zerfallen sind wie bei einer Temperatur von 52 bis 54°, so ist doch bei Zimmertemperatur bedeutend weniger Stickstoff der Peptone und der organischen Basen gebildet worden.

Auf Fig. 2 ist die Menge des nach der Autolyse bei Zimmertemperatur erhaltenen Stickstoffs der Peptone, der Diaminosäuren und des Ammoniaks dargestellt.

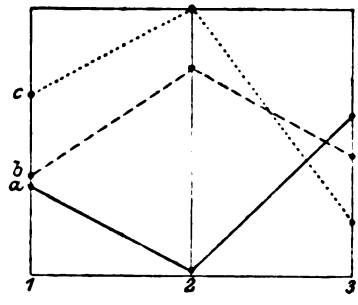


Fig. 2. *1* Peptone, *2* Diaminosäuren, *3* Ammoniak. *a* in Wasser, *b* in Glucose, *c* in Glucose + KH_2PO_4.

Versuch 3.

21 Portionen Zymin. Autolyse bei 18 bis 19°. Die einen Portionen in 100 ccm Wasser, andere in 100 ccm 5%iger Glucoselösung, wieder andere in 100 ccm 5%iger Milchzuckerlösung. 2 Portionen 7 Tage in Wasser, worauf 20 g Glucose hinzugesetzt wurden. Destillation bei 100°.

Tage	Wasser		Glucose 5%		Milchzucker 5%		Wasser (7 Tage), hierauf Glucose 20% (5 Tage)	
3	5,37 4,69	3,45[1]	4,96 5,51	3,65(+5%)	—	—	—	—
5	9,09	7,51	6,61	5,03(−33%)	—	—	—	—
7	11,02 11,30	9,58	7,17 7,44	5,77(−39%)	10,41 10,19	8,72(−9%)	—	—
9	14,88	13,30	10,46	8,88(−33%)	—	—	—	—
12	14,61 14,99	13,30	11,57 10,89	9,65(−27%)	11,99	10,41(−20%)	11,71 8,96	8,81

Versuch 4.

12 Portionen Zymin, je 6 g in 100 ccm Wasser. In 10 Portionen wurden je 0,15 g Leucin hinzugefügt (16 mg Stickstoff). Hierauf wurden zu den Leucinportionen nach 5 Tagen zu 2 Portionen je 10 g Glucose, zu 2 Portionen je 10 g Glucose und je 2 g KH_2PO_4 hinzugefügt. In den 2 Kontrollportionen wurde sofort nach dem Hinzufügen des Leucins der

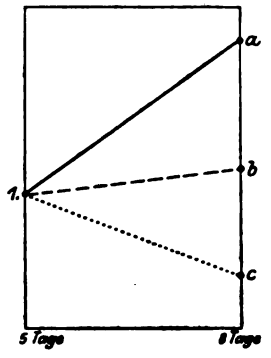


Fig. 3. Bildung des Ammoniaks in Gegenwart von Leucin.
a in Wasser, *b* nach 5 Tagen wurde Glucose hinzugefügt, *c* nach 5 Tagen wurde Glusose + KH_2PO_4 hinzugefügt.

[1]) Alle mittleren Zahlen sind nach Abzug des ammoniakalischen Stickstoffs angegeben, der am Anfange des Versuches vorhanden war (1,58 mg).

Ammoniakstickstoff bestimmt. Gefunden wurden im Mittel 1,39 mg. Autolyse bei 18 bis 19°. Destillation bei 100°.

	Bedingungen des Versuches	Menge des Ammoniak-N			
		mg	Mittel mg	%	Assimiliert %
1.	Leucin 5 Tage	5,92 6,75	4,95[1])	100,0	—
2.	Leucin 8 Tage	11,99	10,60	214,0	—
3.	Wasser 5 Tage	5,92 6,47	4,81	97,2	—
4.	Leucin 5 Tage, hierauf Glucose 3 Tage	7,72 6,89	5,91	119,3	—
5.	Leucin 5 Tage, hierauf Glucose + KH_2PO_4 3 Tage	2,75 3,58 4,27	1,93	39,0	61

Die Ergebnisse des Versuches sind in Fig. 3 dargestellt.

Versuch 5.

12 Portionen Hefanol, je 10 g in 150 ccm Wasser, davon wurden bei 2 Portionen noch je 0,3 g Leucin hinzugefügt. Nach 5 Tagen wurden bei 3 Wasserportionen und den beiden Leucinportionen je 25 g Glucose und je 4 g KH_2PO_4, bei 2 Wasserportionen je 2 g Brenzcatechin hinzugefügt. Autolyse bei 19 bis 20°.

1. Destillation bei 40°.

	Bedingungen des Versuches	Ammoniak-N			
		mg	Mittel mg	%	Assimiliert %
1.	Autolyse 5 Tage in Wasser	29,6 28,4	29,0	100	—
2.	Autolyse 5 Tage in Wasser u. 4—5 Tage Glucose + Phosphat	19,22 19,18	19,2	67	33
3.	Autolyse 5 Tage in Leucin u. 4—5 Tage Glucose + Phosphat	7,1 12,6	9,9	35	65
4.	Autolyse 5 Tage in Wasser u. 4—5 Tage Brenzcatechin	30,1 34,66	32,3	112	—

[1]) Alle mittleren Zahlen sind nach dem Abzug des ammoniakalischen Stickstoffs der Kontrollportion angegeben (1,39 mg).

b) Destillation bei 100°.

Bedingungen des Versuches	Ammoniak-N		
	mg	%	Assimiliert %
1. Autolyse 5 Tage in Wasser	46,7 [1])	100	—
2. Autolyse 5 Tage in Wasser u. 5 Tage Glucose + Phosphat	25,2	54	46
3. Autolyse 5 Tage in Wasser u. 3 Tage Brenzcatechin	45,6	100	—

Vergleichen wir die durch Destillation bei 100° und bei 40° erhaltenen Mengen Ammoniakstickstoffs:

Wasser . . . . . 46,7 — 29,0 = 17,7
Glucose + KH_2PO_4 . . 25,2 — 19,2 = 6,0

so sehen wir, daß bei der Autolyse in Wasser fast 3mal so viel labile, sich bei 100° unter Bildung von Ammoniak spaltende Stickstoffverbindungen erhalten werden wie bei der Autolyse in Glucoselösung + KH_2PO_4. In letzterem Falle erhalten wir stabilere Verbindungen.

Versuch 6.

10 Portionen Hefanol, je 6 g in 100 ccm 0,2%iger Lösung sauren apfelsauren Ammoniaks (berechnet wurden 18,54 mg Ammoniakstickstoff). Bei 3 Portionen wurden je 10 g Glucose und 2 g KH_2PO_4 unmittelbar vor dem Beginn des Versuches hinzugefügt, bei 2 Portionen erst nach 4tägiger Autolyse. Autolyse bei 18 bis 19°. In 2 Portionen Hefanol zu je 6 g wurden im Mittel 10,1 mg Ammoniakstickstoff gefunden, d. h. bedeutend mehr als in Zymin. Destillation bei 100°.

Bedingungen des Versuches		Menge des Ammoniak-N			
		mg	Mittel mg	% der Kontroll-portion	Assimiliert in % der Kontrollportion
1.	Kontrollportionen	29,21 31,97	30,59	100	—
2.	4 Tage (Wasser)	36,38 38,30	37,34	122	—
3.	7 Tage (Wasser)	47,48	47,48	155	—
4.	Glucose + KH_2PO_4 4 Tage	17,50 14,47	15,98	52	48
5.	Dasselbe 7 Tage	14,04	14,04	46	54
6.	Autolyse 4 Tage in Wasser, hierauf Glucose + KH_2PO_4 3 Tage	33,57 33,90	33,73	110	12

[1]) Mittel aus den beiden Bestimmungen nach Entfernung der Eiweißstoffe durch Citronensäure und Pikrinsäure.

Versuch 7.

4 Portionen Hefanol je 10 g + 20 g Glucose + 4 g KH_2PO_4 in 150 ccm Wasser. Bei 3 Portionen wurden außerdem 0,3 g saures apfelsaures Ammoniak hinzugefügt. Autolyse 7 bis 8 Tage bei 19 bis 20°. In der Lösung des apfelsauren Ammoniaks wurden 31,6 und 31,0 mg, d. h. im Mittel 31,3 mg Ammoniakstickstoff gefunden. Destillation bei 40°.

	Ammoniak-N	
Ohne Ammon. bimal. . . .	10,45 10,15	Mittel 10,3
Mit „ „ . . .	33,6 34,0	„ 33,8

Nach Abzug des eingeführten Ammoniakstickstoffs: 33,8 — 31,8 = 2,5.

Aus den beiden letzten Versuchen geht hervor, daß das Ammon. bimal., das an und für sich nicht assimiliert wird, die Assimilierung des in dem Hefanol enthalten gewesenen Ammoniakstickstoffs befördert. So waren zu Beginn des Versuches 11,2 mg Ammoniakstickstoff vorhanden, es blieben nur 2,5 mg, demnach wurden assimiliert 8,7 mg.

Versuch 8.

6 Portionen zermahlene Erbsensamen je 5 g mit Takadiastase je 0,5 g. Autolyse bei 18 bis 19°. Destillation bei 100°.

	9 Tage			16 Tage	
	mg	Mittel mg	%	mg	%
Ohne Sauerstoff	4,69 4,55	4,62	100,0	4,68	101,3
An der Luft bei Schütteln	4,27 4,13	4,20	90,9	5,51	119,2

Versuch 9.

2 Portionen Weizenkeime je 15 g wurden in 150 ccm Toluolwasser bei Zimmertemperatur (18 bis 20°) der Autolyse unterworfen, die eine Portion in Abwesenheit von Sauerstoff während 17 Tagen, die andere ebenfalls ohne Sauerstoff während 8 Tagen; hierauf in einen großen Kolben umgegossen und im Verlaufe von 9 Tagen häufig geschüttelt. Destillation bei 100°.

Ohne Sauerstoff . . . 16,5
An der Luft 21,9

Versuch 10.

40 g Hefanol wurden nach 3tägiger Autolyse in Toluolwasser bei 54° unter Zutritt von Luft abfiltriert. Das Filtrat wurde bis zu 600 ccm verdünnt. Es wurden Portionen zu 50 ccm genommen und von neuem einer Autolyse an der Luft während 6 Tagen bei 16 bis 20° unter verschiedenen Bedingungen unterworfen. Destillation bei 100°.

	Ammoniak-N mg
1. Kontrollportion	5,58
2. Mit 25 ccm H_2O_2 3% [1])	11,44
3. Mit 25 ccm H_2O_2 3% und 0,5 g Fe_2SO_4	22,05
4. Mit 0,5 g Alloxan (rötlich-orangefarbene Flüssigkeit)	15,3
5. Mit überschüssigem Isatin	10,06

Versuch 11.

9 Portionen Zymin je 5 g in 85 ccm Flüssigkeit. Autolyse 9 Tage bei 19 bis 20°. Destillation bei 100°.

1. Brenzcatechin je 1 g.

Wasser	1,87 1,74	Mittel 1,8
Glucose 10 g	1,04 1,91	Mittel 0,97

2. Resorcin je 1 g.

Wasser	4,63	Mittel 4,6
Glucose 10 g	1,87 1,74	Mittel 1,8

3. Isatin im Überschuß [2]).

Wasser	33,6

Versuch 12.

4 Portionen Hefanol in 100 ccm Flüssigkeit. Autolyse 4 Tage bei 40 bis 45°. Destillation bei 100°.

Wasser	30,03 40,79	Mittel 39,41 (100)
KH_2PO_4 3 g	22,87 24,26	Mittel 23,56 (59,7)

Versuch 13.

2 Portionen Hefanol je 10 g + 20 g Glucose + 4 g KH_2PO_4 in 150 ccm Lösung von brenzweinsaurem Ammoniak, erhalten aus käuflichem Acidum pyrotartaricum, das 90,3 und 90,7 mg (Mittel 90,5 mg) Ammoniakstickstoff enthielt. Autolyse bei 19 bis 20°.

Ammoniakstickstoff wurde gefunden:

	Destillation bei 40°	Zweite (ergänzende) Destillation bei 100°
Nach 2 Tagen	102,9	8,26
Nach 3 Tagen	103,14	8,97

Versuch 14.

4 Portionen Hefanol je 10 g. 2 Portionen in 150 ccm Wasser und 2 Portionen in 150 ccm Lösung von Ammon. bimal. (Stickstoff 20,88 und 16,7). Autolyse 5 bis 6 Tage bei 20°. Destillation bei 40°.

[1]) Der Überschuß an H_2O_2 wurde vor der Destillation durch tierische Kohle zerlegt.

[2]) Flüssigkeit gelb, Zymin violett.

	Destillation bei 40°	Zweite Destillation bei 100°
Nach 5 Tagen:		
Wasser	28,46	22,54
Ammon. bimal. .	43,8	19,6
43,8 — 20,88 = 22,98		
Nach 6 Tagen:		
Wasser	28,9	
Ammon. bimal. .	41,65	27,3
41,65 — 16,7 = 24,95		

In Gegenwart von Ammon. bimal. wird etwas weniger Ammoniak gebildet.

Versuch 15.

3 Portionen Hefanol je 10 g + 20 g Glucose + 4 g KH_2PO_4 + 0,3 g Leucin + Ammon. bimal. (31,3 mg Ammoniakstickstoff) in 150 ccm Wasser. Gärung bei 20°. Analyse nach 5 Tagen.

Destillation bei 40°	Zweite Destillation bei 100°
46,84 / 47,14 } 46,99	7,98 / 9,80 } 8,88

46,99 — 31,3 = 17,69.

Versuch 16.

3 Portionen je 10 g Hefanol + 20 g Glucose + 4 g brenztraubensaures Ammoniak[1]) (Ammoniakstickstoff 87,22 und 88,41 mg, im Mittel 87,8 mg) in 150 ccm Wasser. Gärung bei 20°. Analyse nach 4 Tagen. Destillation bei 40°.

1. 106,96
2. 103,7

Nach 10 Tagen:

3. 100,66.

Bei den hier beschriebenen Versuchen über die Bildung und den Verbrauch des Ammoniaks während der Autolyse der Pflanzen haben wir fast ausschließlich mit abgetöteter Hefe[2]) gearbeitet (Zymin, glykogenarmes Zymin, Hefanol). Die Hefe besitzt für derartige Versuche den Vorzug, daß sie hauptsächlich aus Eiweißstoffen besteht und wenig andere Stoffe enthält, die irgendeinen Einfluß auf den Ammoniak haben könnten. So tritt z. B. bei der Hefe infolge der geringen Menge von Kohlenhydraten die Abhängigkeit der Ammoniakbildung von diesen

[1]) Zu der Brenztraubensäure wurde wässerige Ammoniaklösung bis zum Eintreten der alkalischen Reaktion hinzugefügt, die nach dem Hinzufügen von KH_2PO_4 sauer geworden war.

[2]) Zu beziehen bei Anton Schroder, München, Landwehrstr. 45.

sehr deutlich zutage. Die Versuche ergaben nachstehende Resultate:

1. Die Autolyse in Wasser ist begleitet von einer beträchtlichen Bildung von Ammoniak wie auch von Stoffen, die Ammoniak leicht abspalten.

2. Das Hinzufügen von Phosphaten zum Wasser hält den Prozeß der Ammoniakbildung beträchtlich auf. KH_2PO_4 wirkt in dieser Beziehung viel stärker als K_2HPO_4.

3. Glucose hält die Ammoniakbildung noch stärker auf[1]).

Da durch große Mengen von Kohlenhydraten auch der Zerfall der Eiweißstoffe aufgehalten wird, wie dies aus den unter der Leitung von Palladin ausgeführten Arbeiten von T. Gromow[2]) hervorgeht, so wurden bei unseren Versuchen Mengen von Glucose verwendet, die fast gar keine Wirkung auf den Zerfall der Eiweißstoffe ausübten. Allein trotz des starken Zerfalls der Eiweißstoffe in Gegenwart von Glucose wurde Ammoniak, oder Stoffe, die Ammoniak leicht abspalten, doch nur in minimalen Mengen erhalten. In Gegenwart von KH_2PO_4 wird die hemmende Wirkung der Glucose noch mehr verstärkt. Geht die Autolyse der Hefe anfangs nur in Wasser vor sich, worauf nach etwa 5 Tagen Glucose hinzugesetzt wird, oder Glucose + KH_2PO_4, so hört nach Hinzufügung von Glucose allein die weitere Bildung von Ammoniak fast gänzlich auf, während nach Hinzufügung von Glucose und KH_2PO_4 die Menge des bereits gebildeten Ammoniaks (oder der Ammoniak leicht abspaltenden Stoffe) abzunehmen beginnt.

In Gegenwart von Leucin geht der umgekehrte Prozeß der Assimilation des gebildeten Ammoniaks noch energischer vor sich. Hieraus folgt, daß während der Autolyse nicht nur Reaktionen des Zerfalls, sondern auch synthetische Reaktionen statthaben.

Die Bedeutung der Glucose und der Phosphate kann folgendermaßen erklärt werden:

Bei dem Zerfall der Eiweißstoffe aus den erhaltenen Aminosäuren bilden sich anfangs Aporrhegmen. Z. B. Bildung der

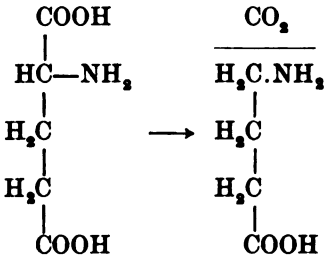
---

[1]) Da in den Pflanzen gewöhnlich große Mengen von Kohlenhydraten enthalten sind, so wird es verständlich, weshalb bei der Autolyse nur minimale Mengen von Ammoniak erhalten werden.

[2]) T. Gromow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 300, 1904.

Diamine aus den Diaminosäuren, von Butylamin aus Valeriansäure[1]).

Ackermann und Kutscher[2]) bezeichnen bekanntlich unter dem Namen Aporrhegma „alle diejenigen Bruchstücke der Aminosäuren des Eiweißes, die aus diesen auf physiologischem Wege, und zwar im Leben der Tiere sowohl wie der Pflanzen, entstehen können". So gelingt es z. B. „durch Fäulnis von Glutaminsäure, den in der Nähe stehenden Komplex CO^2 abzuspalten und so zu γ-Aminobuttersäure zu gelangen, die mit Alkaloidfällungsmitteln reagiert".



Die Aporrhegmen unterliegen entweder einem weiteren Zerfalle und einer weiteren Oxydation mit Ammoniakbildung, oder aber sie geben das Material für die Synthese neuer Stickstoffverbindungen ab. Der erstere Fall gelangt zur Beobachtung bei Vorhandensein eines Oxydationsapparates (bei warmblütigen Tieren) oder bei Mangel an Stoffen (Kohlenhydraten), die mit den Aporrhegmen neue Verbindungen ergeben können (Autolyse der Hefe in Wasser). Der zweite Fall, d. h. die Synthese neuer Stoffe aus den Aporrhegmen, kann nur bei Vorhandensein von Nährmaterial (und schwacher oxydierender Fähigkeit) eintreten, was bei den Pflanzen beobachtet wird. In der Tat ist bei den Pflanzen die Methylierung der Aporrhegmen sehr verbreitet. „Dieser Vorgang der Methylierung hat für die Physiologie erneutes Interesse gewonnen, seitdem R. Engeland[3]) den Nachweis erbrachte, daß eine erschöpfende

[1]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. 18, 435, 1909.

[2]) D. Ackermann und Fr. Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 265, 1910.

[3]) R. Engeland, Sitzungsber. z. Beförderung d. gesamt. Naturwiss. z. Marburg, 10. Febr. 1909.

Methylierung der meisten Aminosäuren des Eiweißmoleküls, also die Überführung in ihre Betaine, ein leicht auszuführender Versuch sei, und ferner darauf hingewiesen hatte, daß sich nun die weite Verbreitung der Betaine in den Pflanzen und wahrscheinlich auch in den Tieren erklären und schließlich auf die dem Eiweiß entstammenden Aminosäuren zurückführen läßt. In weiteren Mitteilungen hat Engeland[1]) dann die Beziehungen der Betaine und anderer künstlich leicht zu erzeugender Methylierungsprodukte der im Eiweiß steckenden Aminosäuren zu den Alkaloiden erörtert"[2]). Nach der Ansicht von Pictet wird die Methylierung durch Formaldehyd hervorgerufen. Ich vermute, daß die Methylierung der Aporrhegmen auf Kosten der Glucose oder auf Kosten von Zwischenprodukten ihres Zerfalls erfolgt.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß nicht nur die Methylierung, sondern auch noch andere synthetische Prozesse auf Kosten der Aminosäuren und ihre Aporrhegmen auf Kosten der Glucose vor sich gehen. Aus diesem Grunde kommt es denn auch bei der Autolyse von Hefe bei Anwesenheit von Glucose nicht bis zur Bildung von Ammoniak. Setzt man dagegen nach der Autolyse der Hefe in Wasser nur Glucose hinzu, so kann das sich bildende Ammoniak (oder Ammoniak leicht abspaltende Stoffe) nicht mehr zu synthetischen Prozessen dienen. Damit derartige synthetische Prozesse vor sich gehen können, muß die Glucose zusammen mit KH_2PO_4 hinzugefügt werden.

Unsere Versuche weisen auf eine Abhängigkeit der Menge des nach der Autolyse gefundenen Ammoniaks von der Menge der Stoffe hin, die von Phosphorwolframsäure gefällt werden (Diaminosäuren). Je mehr Ammoniak gefunden wurde, um so weniger Stoffe waren vorhanden, die von Phosphorwolframsäure gefällt werden.

Ich vermute, daß man die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffe nicht nur als Produkte des Zerfalls der Eiweißstoffe ansehen muß, sondern auch als Produkte der Synthese aus Aporrhegmen (oder Ammoniak) und Glucose.

---

[1]) R. Engeland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 2962; Arch. d. Pharmazie 147, 463.

[2]) D. Ackermann und Fr. Kutscher, l. c. S. 267.

4. Die minimalen Mengen des bei der Autolyse sich bildenden Ammoniaks können als indirekter Beweis dafür dienen, daß die Bildung des Ammoniaks ein reversibler Prozeß ist.

5. Bei den Bedingungen, unter denen unsere Versuche angestellt worden sind, wurde brenzweinsaures Ammoniak nicht assimiliert. Saures apfelsaures Ammoniak wurde nicht assimiliert, begünstigte indessen die Assimilation des in dem Hefanol enthalten gewesenen Ammoniaks. Brenztraubensaures Ammoniak wurde ebenfalls nicht assimiliert.

6. Die Einführung von Leucin übt keinerlei Wirkung auf die Menge des sich bei der Autolyse von Hefe in Wasser bildenden Ammoniaks aus.

7. Milchzucker hält die Bildung von Ammoniak nur in sehr geringem Grade auf.

8. Die Frage nach der Einwirkung des Sauerstoffs auf die Bildung von Ammoniak läßt sich schwer entscheiden. Wie aus den in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchungen hervorgeht, halten alle oxydierenden Reaktionen die Arbeit des proteolytischen Ferments[1]) auf und damit auch die Bildung von Ammoniak. So wird z. B. durch Brenzcatechin, das die Arbeit des proteolytischen Ferments stark verzögert, der Prozeß der Ammoniakbildung zum Stillstande gebracht. Aus diesem Grunde darf mit Oxydatoren nur auf die Produkte der Autolyse eingewirkt werden. Unter solchen Bedingungen haben Sauerstoff, Wasserstoffsuperoxyd, Wasserstoffsuperoxyd und Fe_2SO_4, Isatin und Alloxan[2]) eine günstige Wirkung ausgeübt. Man wird ferner im Auge behalten müssen, daß oxydierende Reaktionen ohne Teilnahme von Sauerstoff und Luft auf Kosten des Wassers vor sich gehen können[3]).

9. Das Studium des Prozesses der Ammoniakbildung führt zu einer Feststellung der Abhängigkeit der Gärung und der

---

[1]) W. Palladin und J. Kraule, diese Zeitschr. **89**, 290, 1912; wie auch die in nächster Zeit erscheinende Arbeit über denselben Gegenstand von Palladin, Alexandrow, Iwanoff und Lewitzky in dieser Zeitschrift.

[2]) A. Strecker, Annal. d. Chem. **123**, 363, 1862. — W. Traube, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 3145, 1911.

[3]) A. Bach, diese Zeitschr. **31**, 443, 1911; **33**, 282, 1911; **38**, 154, 1912. — W. Palladin, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 91, 1912.

Atmung von den Prozessen des Abbaues der Eiweißstoffe. Nicht die gesamte, während der Gärung und Atmung ausgeschiedene Kohlensäure wird auf Kosten der Glucose gebildet: es ist möglich, daß ein Teil derselben aus den Aminosäuren erhalten wird. So hat Ehrlich nachgewiesen, daß Amylalkohol aus Leucin bei Abscheidung von Kohlensäure nach dem allgemeinen Schema

$$R.CH.NH_2.COOH + H_2O = R.CH_2OH + NH_3 + CO_2$$

erhalten wird.

O. Neubauer vermutet, daß bei dem Zerfalle von Aminosäuren Ketosäuren als Zwischenprodukte auftreten können. C. Neuberg[1]) wies nach, daß Ketosäuren durch Hefe unter Bildung von Kohlensäure der Gärung unterliegen. Neuberg und Karczag[2]) sagen: „Gerade die α-Ketosäuren sind es, die mit besonderer Leichtigkeit der zuckerfreien Gärung unterliegen." So zerfällt die Brenztraubensäure in Kohlensäure und Acetaldehyd:

$$CH_3.CO.COOH = CO_2 + CH_3.COH.$$

Nach Dakin[3]) wird Histidin in der Leber zu Kohlensäure, Acetessigsäure (eine Ketosäure) und Harnstoff abgebaut. Die Bildung von Acetessigsäure weist auf eine Abhängigkeit der Bildung von Acetonkörpern von dem Prozesse des Abbaues der Eiweißstoffe hin.

Solange als man nur stickstoffhaltige Stoffe zu den Abbau-Produkten der Eiweißstoffe rechnete, schien es keine Schwierigkeiten darzubieten, den Prozeß des Eiweißstoffwechsels von den Prozessen der Gärung und der Atmung, als Prozessen des Abbaues und der Oxydation der Glucose, abzugrenzen und diese Prozesse unabhängig voneinander zu studieren. Jetzt hingegen, wo wir sehen, daß unter den Produkten des Abbaues der Eiweißstoffe verschiedene stickstofffreie Verbindungen (Ketosäuren, Ketone, Aldehyde und Alkohole) erhalten werden, wird man mit größter Vorsicht vorgehen müssen, um nicht

---

[1]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, diese Zeitschr. **31**, 170, 1910. — C. Neuberg und L. Tir, l. c. **32**, 323, 1911. — C. Neuberg und L. Karczag, l. c. **36**, 60, 68, 76, 1911.

[2]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. **37**, 172, 1911.

[3]) H. D. Dakin und A. J. Wakeman, Journ. Biolog. Chem. **10**, 499, 1912. — Centralbl. f. Biochem. u. Biophysik **13**, 24, 1912.

stickstofffreie Produkte des Eiweißabbaues für Zwischenprodukte des Abbaues von Glucose anzusehen. So sind z. B. die unter den Produkten des Abbaues von Eiweißstoffen erhaltenen Ketosäuren nach C. Neuberg und J. Kerb[1]) vielleicht auch Zwischenprodukte des Abbaues der Glucose. In diesem Umstande erblicke ich ein neues Beispiel für den Zusammenhang zwischen den Prozessen des Abbaues der Eiweißstoffe und den Produkten der Gärung und Atmung. Erhält man unter den Prozessen des Abbaues von Eiweißstoffen die gleichen Stoffe wie unter den Zwischenprodukten des Zerfalls der Glucose, so folgt hieraus, daß, welchen Ursprungs die erwähnten Stoffe auch sein mögen, dieselben in gleicher Weise nicht nur als Material für die Synthese, sondern auch als Material zur Erlangung von Energie bei den Prozessen der Gärung und der Atmung dienen können.

10. Vergleichen wir die Mengen Ammoniak, die bei 40° und bei 100° abdestilliert werden, so erhalten wir nachstehende Zahlen pro 10 g Hefanol:

	40°	100°	Unterschied	Unterschied in %
1. Kontrollportion	11,27	16,8	5,53	100
2. Autolyse während 5 Tagen in Wasser .	29,0	46,7	17,7	320
3. Nach 5tägiger Autolyse in Wasser, 5 Tage auf Glucose und KH_2PO_4	19,2	25,2	6,0	108

Nach der Autolyse in Wasser ergaben sich demnach dreimal mehr Ammoniak bei 100° abspaltende Stoffe, als deren im Hefanol enthalten waren. Nach Hinzufügung von Glucose und KH_2PO_4 nahm die Menge solcher Stoffe dagegen von neuem um das dreifache ab.

[1]) C. Neuberg und J. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 114, 1912.

Über die Bestimmung von Phenol und Parakresol in ihren Gemischen.

(Den Herren M. Siegfried und R. Zimmermann zur Antwort.)

Von

Hugo Ditz und Friedrich Bardach.

(Aus dem anorgan.-technolog. Laboratorium der deutschen techn. Hochschule in Prag.)

(Eingegangen am 21. Mai 1912.)

Die in einer Arbeit von M. Siegfried und R. Zimmermann[1]) enthaltene Kritik über von H. Ditz und F. Cedivoda im Jahre 1899 veröffentlichte Untersuchungen[2]) veranlaßten uns vor kurzem[3]), die von D. und C. mit Phenol und p-Kresol durchgeführten Versuche zu wiederholen. Wir konnten dabei ihre Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlußfolgerungen durchaus bestätigen und den Nachweis erbringen, daß S. und Z. bei Durchführung ihrer einschlägigen Versuche von den wesentlichsten vorgeschriebenen Arbeitsbedingungen abgewichen sind. Gleichzeitig prüften wir das damals prinzipiell angegebene Verfahren speziell für die Bestimmung von Phenol neben p-Kresol in ihren Gemischen, um dasselbe mit den von S. und Z. ausgearbeiteten Methoden (nach ihren eigenen Beleganalysen) in Vergleich zu ziehen. Dieser Vergleich fiel nun durchaus zu Ungunsten der Arbeitsweise von S. und Z. aus.

---

[1]) M. Siegfried und R. Zimmermann, diese Zeitschr. **29**, 368, 1910.

[2]) H. Ditz und F. Cedivoda, Zeitschr. f. angew. Chem. **12**, 873, 897, 1899.

[3]) H. Ditz und F. Bardach, diese Zeitschr. **37**, 272, 1911.

Vor kurzer Zeit erschien nun eine weitere Abhandlung von S. und Z.[1]), worin sie wohl zugeben müssen, bei ihren damaligen Versuchen die vorgeschriebenen Versuchsbedingungen nicht eingehalten zu haben, sich aber unter Anführung einiger neuer Versuche doch bemühen, einen Teil unserer Angaben zu entkräften, während sie einen weitaus größeren Teil einfach seitenweise überschlagen.

Gleich auf der ersten Seite ihrer Abhandlung führen S. und Z. zu unserem Erstaunen wieder an, daß man ihre b_1-Methode, bei bekannter Summe der Gewichte des Phenols und des Kresols, zur Ermittlung der Bestandteile des Gemisches verwenden könne, ohne auch nur ein Wort darüber zu verlieren, was wir auf S. 309 und 310 diesbezüglich bemerkt haben. Wir konnten nämlich aus ihren eigenen Versuchsdaten berechnen, daß man bei Verwendung ihrer b_1-Methode Resultate erhält, die in einem Falle $+22{,}8\%$ beim Kresol (absolut) und $-12{,}6\%$ beim Phenol von den Sollwerten (absolut) abweichen und, bezogen auf das Phenolgemisch, mit einem Fehler von nicht weniger als $\pm 8{,}1\%$ behaftet sind[2]).

S. und Z. geben die „Unterlassungssünde“ bezüglich der Nichterwähnung der Abhandlung des einen von uns[3]) zu, verschweigen dies aber durch Verschleierung des Sachverhaltes in einem milderen Lichte und, bezogen auf das darüber keine weiteren Worte verlieren, möchten aber fast glauben, daß ihre diesbezüglichen Ausführungen doch zu wenig erscheinen zu lassen. Wir wollen

---

[1]) M. Siegfried und R. Zimmermann, diese Zeitschr. **38**, 434, 1912. — Auf das Erscheinen dieser Abhandlung wurden wir erst durch das Referat im Chem. Centralbl. **1912**, I, 1252 (Heft vom 10. April) aufmerksam, worauf auch die Verzögerung unserer Entgegnung zurückzuführen ist.

[2]) Einen Vergleich dieser Resultate mit den nach unserer Methode erhaltenen haben wir auf S. 310 unserer Abhandlung angeführt, während wir auf S. 309 in dem von S. und Z. angeführten Beispiel, abgesehen von einem Rechenfehler, auch den Rechnungsmodus als unrichtig hinzustellen uns bemüßigt fanden. Dies alles wird von S. und Z. einfach ignoriert und sie empfehlen nach wie vor die nach ihren eigenen Versuchen mit einem Fehler von bis 23% (auf den Sollwert des betreffenden Bestandteiles bezogen) behaftete Methode.

[3]) H. Ditz, Zeitschr. f. angew. Chem. **14**, 160, 1901.

überzeugend wirken, als daß sie damit den angestrebten Zweck erreichen könnten[1]).

Wenn S. und Z. erstaunt tun, daß D. und C. keine Versuche mit Gemischen von Phenol und p-Kresol durchgeführt hatten, dann sind sie sich darüber noch immer nicht im klaren, daß die Arbeit von D. und C. von technischen Gesichtspunkten aus durchgeführt wurde, demnach Gemische von Phenol und p-Kresol für die Erprobung der Methode bedeutungslos waren. Daß S. und Z. im Jahre 1910 eine auf ähnlichem Prinzip beruhende Methode zur Bestimmung von Phenol neben p-Kresol im Harn ausarbeiten wollten, konnten D. und C. nicht gut schon im Jahre 1899, also 11 Jahre früher, berücksichtigen: Daß aber die Arbeitsweise von D. und C. auch für die Gemische dieser beiden Phenole, und zwar mit weit besseren Resultaten, als die Methode von S. und Z. anwendbar ist, haben wir uns eben bemüht durch unsere Versuche zu erweisen.

Um die Verwendung einer 25%igen statt der gewöhnlichen konzentrierten 37%igen Salzsäure [für die Herstellung der vorgeschriebenen Salzsäure (1:1)] gerechtfertigt erscheinen zu lassen, weisen S. und Z. darauf hin, daß im chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts der Universität Leipzig als konzentrierte Salzsäure eine 25%ige angesehen wird. Ohne dies in Zweifel ziehen zu wollen, müssen wir aber dagegen Einwand erheben, daß die Bezeichnung „konzentrierte Salzsäure" für die ca. 37%ige von S. und Z. als ein abweichender Gebrauch des Prager Laboratoriums hingestellt wird, den D. und C. nicht als bekannt hätten voraussetzen sollen[2]). Wir

[1]) Bezüglich des Sachverhaltes sei auf S. 275 bis 277 unserer Abhandlung verwiesen. Wir glauben übrigens, daß weit „humoristischer" als das von S. und Z. (S. 436) gebrachte, ihnen humoristisch erscheinende Zitat aus der Abhandlung des einen von uns, wohl ihre Bemühung wirkt, glauben machen zu wollen, sie hätten die Arbeit von D. so genau gelesen, daß ihnen die „humoristischen" Stellen nicht entgangen seien, während sie nicht in Erinnerung behielten, daß auch der Bromüberschuß und nicht nur die Einwirkungszeit eine sehr wesentliche, „peinlich" einzuhaltende Arbeitsbedingung ist. Diese sehr bedauerliche Vergeßlichkeit wäre um so unbegreiflicher, als gerade dieses Moment wiederholt und auch in gesperrten Lettern, also nicht gerade unauffällig, in dieser Abhandlung hervorgehoben wird. Wenn S. und Z. nicht schon aus den bis ins Detail gehenden Zahlenangaben von D. und C. den einzuhaltenden Bromüberschuß ersehen konnten, so hätte sie eine auch nur einmalige Lektüre der Abhandlung des einen von uns (1901) darüber sehr genau aufgeklärt.

[2]) Die Arbeit von D. und C. wurde, nebenbei erwähnt, im chemisch-technologischen Laboratorium der technischen Hochschule in Brünn durchgeführt.

wollen es versuchen zu beweisen, daß die Bezeichnung „konzentrierte Salzsäure" für die Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 mit ca. 37% HCl-Gehalt allgemein gebräuchlich ist.

In dem wohl sehr verbreiteten Buche von C. Krauch, „Die Prüfung der chemischen Reagenzien auf Reinheit", 3. Aufl. (1896), S. 92, findet man bei „Chlorwasserstoffsäure · Acidum hydrochloric. purum conc." die Angabe: „Spez. Gew. = 1,19. 100 Gewichtsteile dieser Säure entsprechen 37,23% HCl." — Ferner ist in dem wohl auch in Leipzig bekannten „Lehrbuch der analytischen Chemie" von F. P. Treadwell, 1, 6. Aufl. (1908), S. 36 folgendes angegeben[1]):

„Die gewöhnlichen Reagenzien des Laboratoriums sind:

I. Konzentrierte Säuren.

	Spez. Gew.	Gewichtsprozente
1. Salzsäure . . .	1,189	37,9

. . . . . ."

Das „Praktikum des anorganischen Chemikers" von E. Knoevenagel, 2. Aufl. (1909) enthält im Anhang in der Tabelle III die Angabe: „HCl, konz. 10fach normal[2]). — Die „Internationale Analysen-Kommission für Dünge- und Futtermittel" hat im Jahre 1903 eine „Tabelle für eine einheitliche Nomenklatur chemischer Reagenzien und Apparate aufgestellt[3]), in der man angegeben findet:

Bezeichnungen	Spez. Gewicht	Gehalte, Teile
. . . . .		
5. Salzsäure	1,12	24 HCl
6. Konz. Salzsäure . . .	1,20	39 HCl

Wir könnten auch noch weitere Belege dafür erbringen, daß unsere Bezeichnungsart für die ca. 37%ige Salzsäure zutreffend und allgemein üblich ist, womit wir übrigens nicht bezweifeln wollen, daß in manchen Laboratorien, entgegen der sonst gebräuchlichen Bezeichnung, als kon-

---

[1]) Auf S. 251 dieses Lehrbuches heißt es ferner: Die gewöhnliche, reine Handelssäure hat das spezifische Gewicht 1,18 bis 1,19 und ist 36 bis 38%ig.

[2]) Das entspricht einer ca. 37%igen Salzsäure. — Das „Lehrbuch der unorganischen Chemie" von A. F. Holleman, 4. Aufl. (1906), S. 39 sagt darüber: „Die gewöhnliche' reine ‚konzentrierte' oder ‚rauchende' Salzsäure des Handels hat meist das spezifische Gewicht 1,19 und enthält rund 38% HCl." In der 10. Aufl. (1912), S. 37, die soeben erschienen ist, findet sich die gleiche Angabe. Die Bezeichnungen für reine konzentrierte und für rauchende Salzsäure werden also in diesem heute wohl verbreitetsten Lehrbuch der anorganischen Chemie ausdrücklich (und zwar für eine Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19) gleichgesetzt.

[3]) Vgl. Zeitschr. f. angew. Chem. **16**, 657, 1903.

zentrierte Salzsäure die ca. 25%ige angesehen wird. Wir wollen daher auch nicht in Zweifel ziehen, daß S. und Z., in Unkenntnis der üblichen Bezeichnungsart, im guten Glauben eine 25%ige Salzsäure (statt der konzentrierten) verwendeten.

Die S. 437, zweiter Absatz, von S. und Z. gemachte Behauptung, daß Herr Prof. Siegfried infolge brieflicher Mitteilung des einen von uns Bestimmungen nach der von D. und C. angewandten Arbeitsweise ausgeführt habe und zu demselben ungünstigen Resultat wie früher gelangt sei, hätte doch durch Veröffentlichung dieser Versuche bewiesen werden sollen. Da Herr Prof. Siegfried dem einen von uns diese Versuche brieflich mitgeteilt hatte, so könnte (was übrigens brieflich auch geschehen ist) ziffernmäßig nachgewiesen werden, daß auch nicht bei einem einzigen dieser von S. durchgeführten Versuche der richtige Bromüberschuß angewendet wurde.

Statt rund 25 bis 30% verwendete nämlich Herr Prof. Siegfried:

bei 3 Versuchen	(mit Phenol allein)	einen Bromüberschuß	von	4,1%
„ 4	„	(mit Phenol-Kresol-Gemisch)	„	„	„ 15,6 „
„ 2	„	(„ „)	„	„	„ 1,1 „

Das besagt also, daß die obige Behauptung von S. und Z., soweit sie sich auf diese 9 Versuche stützt (deren genaue Wiedergabe Herrn Prof. Siegfried überlassen sei) mit den Tatsachen in dem denkbar größten Widerspruche steht[1]). Wir brauchen uns aber mit diesen nicht veröffentlichten Versuchen nicht weiter zu beschäftigen, da die von S. und Z. neuerdings durchgeführten und angegebenen 7 Versuche uns genügend Material liefern, um ihre sämtlichen, unsere Methode betreffenden kritischen Bemerkungen ad absurdum zu führen.

---

[1]) Während S. und Z. bei den in der ersten Abhandlung angegebenen Versuchen den Bromüberschuß ganz unmotiviert bis auf 450% (vom theoretischen Bromüberschuß) erhöhten, setzte nach obigem Herr Prof. Siegfried, entgegen den Angaben von D. und C. und entgegen den ihm von dem einen von uns auf seinen Wunsch brieflich genauest mitgeteilten Versuchsbedingungen, den Bromüberschuß bis auf 1,1% herab, was jetzt mit dem Ausdruck „unter Vermeidung eines großen Bromüberschusses" bezeichnet wird. Die Anwendung des richtigen Bromüberschusses wurde einfach absichtlich unterlassen, was auch aus dem Folgenden noch hervorgehen wird.

Bei den 7 von S. und Z. jetzt angeführten Versuchen mit Gemischen[1]) wurden die folgenden Bromüberschüsse angewendet:

Versuch	1, 2 und 3 . . .	15,5%	Bromüberschuß[2])
„	4 und 5	1 „	„
„	6	44,4 „	„
„	7	30 „	„

Wie S. und Z. angeben, ist der bei den Versuchen 1 bis 3 gewählte Überschuß „also etwas niedriger, als der von D. und C. angewandte" — tatsächlich ist er nur ungefähr halb so groß — und der bei den Versuchen 4 und 5 „geringer als bei 2 und 3" — tatsächlich beträgt er nach obigem nicht einmal $^1/_{20}$ des vorgeschriebenen Bromüberschusses —. Sie entschließen sich also 2 weitere Versuche durchzuführen, „bei denen ein viel größerer Überschuß von Brom verwendet wurde". Von diesen beiden Versuchen 6 und 7 entspricht nun 7 mit 30% Bromüberschuß beiläufig dem von D. und C. angewandten. Über das dabei gefundene Resultat äußern sich nun S. und Z.: „In Versuch 7 betrug der theoretische Bromüberschuß 30%, es wurden trotz dieses großen Überschusses noch 5% zu wenig Brom gebunden."

Sie wundern sich nun darüber, daß wir bei Verwendung von 30% Bromüberschuß genauere Werte erhalten haben, und noch mehr, daß wir „sogar bei 25% Bromüberschuß genauere Werte als bei 30%" fanden und meinen dann: „Die Differenzen ihrer und unserer Ergebnisse haben möglicherweise ihren Grund in der subjektiven Art des Schüttelns". Ohne zu wissen, wie S. und Z. schütteln, sind wir nun in der Lage zu beweisen, daß die Differenzen in den Ergebnissen ihres Versuches 7 und unserer Versuche weniger in

[1]) Auffallenderweise haben S. und Z. bei ihrer „erneuten Nachprüfung" keine Versuche mit Phenol, bzw. p-Kresol allein nach der Methode von D. und C. durchgeführt. Dies wäre aber wohl am Platze gewesen, da wir z. B. bei Nachprüfung des Versuches 1 der ersten Abhandlung von S. und Z. festgestellt hatten (S. 304 unserer Abhandlung, Fußnote), daß dieser einzige Versuch von S. und Z., bei dem die Resultate von D. und C. anscheinend bestätigt werden, unrichtig ist. Wir vermissen auch die nachträgliche Angabe des Bromüberschusses bei ihren Versuchen mit Phenol (II) und den Gemischen (III B. und C.).

[2]) S. und Z. geben 13% an, die Zahl ist aber falsch gerechnet; ebenso soll es bei Versuch 5, bei der Angabe des Fehlers statt + 7,3% heißen — 7,3%.

der subjektiven Art des Schüttelns, als vielmehr hauptsächlich in der subjektiven Art des Rechnens liegen. Wenn man nämlich den Versuch 7 richtig berechnet, dann ergibt sich die Menge des gebundenen Broms nicht zu 0,1321, wie S. und Z. angeben, sondern zu 0,2744:2 = 0,1372, was (gegenüber 0,1391 Br ber.) einem Fehler von —1,37% entspricht. Der einzige Versuch, den S. und Z. mit dem von uns vorgeschriebenen Bromüberschuß durchgeführt und mitgeteilt haben, ergibt also richtig gerechnet nicht —5,0%, sondern —1,37% Fehler im Bromwert.

Dieses richtiggestellte Ergebnis ist noch immer nicht ganz so günstig wie unsere Resultate, aber es ist auch nicht allzu schlecht, besonders wenn man damit die Fehler vergleicht, die S. und Z. mit ihrer Methode erhalten. Sie geben z. B. selbst als Fehler im Bromwert bei einem ihrer Versuche (S. 442 der letzten Abhandlung) 1,7% an. Der Fehler ist also — S. und Z. werden das wohl jetzt nicht mehr bestreiten können — nach ihren eigenen Versuchen kleiner, das Resultat demnach günstiger, als bei diesem nach ihrer b_2-Methode durchgeführten Versuch.

Wir könnten uns mit diesen Feststellungen begnügen, wollen uns aber doch nicht versagen noch auf einen Umstand hinzuweisen. Während S. und Z. mit 15,5% Bromüberschuß 3 Versuche, mit 1% Bromüberschuß 2 Versuche angeben, haben sie gerade den Versuch mit 30% Bromüberschuß nur ein einziges Mal durchgeführt. Nun differieren ihre Versuche 1 bis 3 (Fehler —3,7%, —5,5%, —3,7%) um 1,8% untereinander und der mittlere Fehler (— 4,3%) weicht also von dem maximalen Fehler um —1,2% ab. Der richtig gerechnete Gesamtfehler bei Versuch 7 beträgt nun nach obigem nur —1,37%. Würden hier auch 3 Versuche durchgeführt worden sein und würde (nach dem Beispiel von Versuch 1 bis 3) die mittlere Differenz auch —1,2% betragen, so könnte sich der Fehler schon auf —0,17% reduzieren und das wäre ein Resultat, das sogar günstiger als die von uns unter gleichen Versuchsbedingungen erhaltenen ist. (Vgl. z. B. S. 301 unserer Abhandlung.)

Daß übrigens S. und Z. nur einen einzigen Versuch mit 30% Bromüberschuß anführen und ihnen hierbei der verhängnisvolle Rechenfehler ein so ungünstiges Resultat vorgetäuscht hatte, erscheint einigermaßen auffallend. Aber auch wenn hier kein Rechenfehler vorliegen würde, der Fehler also tatsächlich —5% betragen würde, so würde

doch wohl das Resultat eines einzigen Versuches als Widerlegung einer großen Anzahl von Versuchsreihen mit Gemischen der verschiedensten Zusammensetzung wohl von niemandem als ausreichend angesehen werden. Wir glauben übrigens nicht fehlzugehen, wenn wir sagen, daß, wenn S. und Z. diesen Versuch 7, bei gleich liebevoller Behandlung wie bei den für die Beweisführung wertlosen Versuchen 1 bis 3 oder 4 bis 5, und wie dies von uns ausnahmslos erfolgt ist, wiederholt durchgeführt und den Mittelwert zur Berechnung verwendet hätten, sie wahrscheinlich nicht einen negativen, sondern einen absolut kleineren, aber positiven Fehler im Bromwert erhalten hätten. Auch glauben wir, daß beim Versuch 6 mit 44% Bromüberschuß der Fehler als Mittelwert mehrerer Versuche positiv und etwas größer erhalten werden müßte, als S. und Z. ihn fanden. Hätten sie übrigens die Resultate ihrer 7 Versuche miteinander verglichen, dann wären sie vielleicht auch auf den Rechenfehler beim Versuch 7 gekommen, denn die absolute Größe ihrer Fehler nimmt mit zunehmendem Bromüberschuß ab und gerade der Versuch 7 würde nach ihrem falsch berechneten Wert eine unerklärliche Ausnahme machen.

Auf die Bemerkungen, die S. und Z. über das Schütteln bei unserer und ihrer Methode machen, wozu sie wohl hauptsächlich der ominöse Rechenfehler veranlaßt hat, brauchen wir wohl nicht näher einzugehen. Wenn S. und Z. unsere Arbeitsweise zur Ermittlung des richtigen Bromüberschusses nicht gefällt, weil man sie zur Bestimmung des Phenols und p-Kresols im Harn „nicht gern" durchführen will, so müssen wir uns eben damit abfinden, daß wir ja, ebensowenig wie D. und C., die Absicht hatten, unsere Methode als Ersatz der b_2-Methode von S. und Z. für die Bestimmung der beiden Phenole im Harn zu empfehlen.

Auch eine Widerlegung ihrer Einwände hinsichtlich der Art der Fehlerberechnung können wir unterlassen, da wir in ihrer letzten Abhandlung vergebens den Nachweis suchen, daß unsere Art der Berechnung grundsätzlich unrichtig oder uns irgendwelche Rechenfehler unterlaufen wären. Nochmals festgestellt sei, daß S. und Z. in ihrer ersten Abhandlung bei keinem einzigen ihrer Versuche eine prozentuale Fehlerberechnung durchführten. Auch darauf hat der eine von uns Herrn Prof. Siegfried brieflich aufmerksam gemacht und darauf ist vielleicht zurückzuführen, daß in der zweiten Abhandlung[1]) (und nun auch in der dritten Abhandlung) die Fehlerberechnung auch in Prozenten erfolgt, allerdings bei den Gemischen nur für die Bromwerte, nicht aber für die zu ermittelnden Bestandteile Phenol und Kresol, bei denen

[1]) M. Siegfried und R. Zimmermann, diese Zeitschr. 84, 462, 1911.

die Fehler nach S. und Z. nur in Grammen beurteilt werden sollen, um nicht so groß zu „erscheinen". Die „ernste Verwahrung" gegen unsere Fehlerberechnung bei ihrer b_2-Methode findet übrigens durch die auf S. 306 und 307 unserer ersten Abhandlung gemachten, von S. und Z. ebenfalls stillschweigend übergangenen Angaben ihre Erledigung.

Wir haben dort die Fehler von 3 ihrer Versuche berechnet, fanden nach ihren eigenen Beleganalysen bis zu 29% (absoluten) Fehler und bemerkten dazu (S. 307), daß bei den erwähnten 3 Versuchen, nach den Angaben von S. und Z. nur der eine Bromwert (b_2) experimentell ermittelt, während der zweite Bromwert (b_1) berechnet wurde. Wir sagen dann wörtlich: „Die angegebenen Fehler sind also hier ausschließlich auf die zur Ermittlung dieses Bromwerts (b_2) vorgeschlagenen Arbeitsweise zurückzuführen." In der Fußnote 1 auf S. 307 findet auch ihr Vorwurf „die ganz andersartige Berechnung" seine Erledigung, indem wir dort ihren gefundenen Bromwert b_2 nach unserer Formel zur Berechnung der Resultate verwendet hatten, also in genau gleicher Weise, wie mit unseren Bromwerten gerechnet hatten. Trotzdem ergab die Rechnung einen fast 3mal so großen absoluten Fehler (+ 24%) für Kresol, als mit dem von uns bei dem analog zusammengesetzten Gemisch nach unserer Methode ermittelten Bromwert.

Daß demnach ihre b_2-Bestimmung, und zwar unabhängig von der b_1-Bestimmung, unserer Methode ganz bedeutend nachsteht, geht also aus den vergleichenden Versuchen unzweifelhaft hervor. Daß unsere Methode auch ihre b_1-Bestimmung an Genauigkeit übertrifft, haben wir mit dem Hinweis auf unsere diesbezüglichen früheren Feststellungen in der Einleitung nochmals hervorgehoben[1]).

Hinsichtlich ihrer b_1-Bestimmung wollen wir aber noch zum Schlusse auf einen Umstand hinweisen, der für die Art und Weise, in der S. und Z. bei „Nachprüfung" der Versuchsresultate anderer Autoren vorgehen, ungemein charakteristisch

[1]) Im letzten Absatz ihrer Erwiderung geben übrigens S. und Z. so ganz nebenbei zu, daß sich die Fehler von b_1 und b_2 addieren können und dann die absoluten Werte für Phenol und Kresol um 1, ja 2 mg von den Sollwerten differieren, wodurch die prozentuale Abweichung groß werden kann. Wir verweisen diesbezüglich auf die Fußnote 2 S. 310 bis 311 unserer Abhandlung, wo festgestellt erscheint, daß bei einem Versuche von S. und Z. der Fehler bei $b_1 - b_2$ (diese Differenz kommt für die Berechnung in Betracht) nicht weniger als + 28% beträgt, worauf sich vielleicht S. und Z. (ohne dies allerdings hervorzuheben) beziehen.

ist. In ihrer zweiten Abhandlung[1]) geben sie Versuche an, die den Vergleich ihrer b_1-Methode mit der Methode von Kossler und Penny[2]) bezwecken. Sie führen nach dieser zunächst je 2 Versuche mit Phenol und p-Kresol allein und dann einige Versuche mit Gemischen durch und kommen schließlich zu dem Ergebnis, daß ihre Methode genauer ist, als die von Kossler und Penny. Bei den zwei mit p-Kresol durchgeführten Versuchen fanden sie nun — 6,2 und — 5,3% Fehler. Nach den Angaben von Kossler und Penny beträgt dagegen, bei Einhaltung der von ihnen festgestellten günstigsten Versuchsbedingungen, der Fehler + 2%. Die Differenzen in den Resultaten gegenüber jenen von S. und Z. würden demnach — 8,2 bzw. — 7,3% betragen und die Differenz vom Sollwert ist bei S. und Z. rund 3mal so groß, als er von Kossler und Penny angegeben worden ist. Nun wurde deren Arbeitsweise auch schon früher von Neuberg[3]) überprüft, und dieser fand im Mittel aus 4 Versuchen beim p-Kresol einen Fehler von — 2%, die absolute Größe des Fehlers demnach genau so groß, wie er von Kossler und Penny angegeben worden ist. Ganz ähnlich, wie bei Überprüfung der Methode von D. und C., begnügen sich aber S. und Z. mit dem Ergebnis ihrer zwei Versuche, und die Ähnlichkeit ihres Vorgehens geht hierbei so weit, daß sie auch bei diesen mit p-Kresol durchgeführten Versuchen die von Kossler und Penny vorgeschriebenen Versuchsbedingungen nicht eingehalten haben. Bei „Nachprüfungen" in der Art, wie sie S. und Z. durchgeführt haben, ist es naturgemäß leicht, eigene Methoden als besser und genauer im Vergleich zu bereits bekannten erscheinen zu lassen.

[1]) Vgl. Fußnote 1 auf S. 354.

[2]) A. Kossler und E. Penny, Zeitschr. f. physiol. Chem. 17, 117, 1893.

[3]) C. Neuberg, ebenda 27, 123, 1899.

Über den Einfluß trockener und feuchter Luft auf den Gasstoffwechsel.

Von

Hans Murschhauser und **Hubert Hidding.**

(Aus dem Laboratorium der akademischen Kinderklinik in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 21. Mai 1912.)

Man war in früherer Zeit geneigt, sich über die Beziehungen äußerer Faktoren zum Stoffwechsel einfachen schematischen Vorstellungen hinzugeben. So erklärte man beispielsweise die Erhöhung des Sauerstoffkonsums bei niedriger Außentemperatur dadurch, daß kalte Luft vermöge ihrer größeren Dichte eine vermehrte Oxydation im Lungenblut veranlasse, daß also eine Mehraufnahme von Sauerstoff auch einen Mehrverbrauch bedinge. Nachdem aber spätere Untersuchungen gezeigt hatten, daß Schwankungen im Sauerstoffgehalt der Luft bis zu 50% aufwärts und 12,7% abwärts bei ein und derselben Temperatur fast keine Änderungen der Stoffwechselgröße veranlassen, konnte die alte Anschauung nicht mehr aufrechterhalten werden; denn wenn derartige Differenzen im Sauerstoffpartialdruck der Luft keine Beeinflussung des Umsatzes erkennen ließen, so kann eine den absoluten Sauerstoffgehalt der Luft selbst in ihren Extremen so minimal ändernde Ursache, wie sie das in Betracht kommende Temperaturintervall vorstellt, den Stoffwechsel im Sinne einer Dichteveränderung der Luft nicht tangieren.

In bezug auf die Wasserdampfausscheidung des Organismus glaubte man die Verhältnisse, wie sie zwischen der Verdunstung von Wasserflächen und dem Wechsel der Luftfeuchtigkeit bestehen, auf die Wasserdampfabgabe des Körpers übertragen zu dürfen. Wenn nun tatsächlich das Experiment eine gewisse Analogie in dieser Hinsicht erkennen ließ, so zeigen doch

wieder manche Erscheinungen, daß es sich bei der Wasserdampfabgabe des Organismus nicht um einen einfachen physikalischen, sondern um einen komplizierten physiologischen Prozeß handelt.

Der Einfluß der atmosphärischen Feuchtigkeit auf den Stoffumsatz hat noch zu wenig Berücksichtigung gefunden, als daß darüber Ansichten bekannt geworden wären. Der einzige, der in der älteren Zeit diese Frage streifte, war Lehmann, und er hat für seine Befunde keine Erklärung abgegeben.

Lehmann[1]) studierte den Einfluß trockener und feuchter Luft auf die Kohlensäureproduktion von Feldtauben, Zeisigen und Kaninchen, und zwar bei drei verschiedenen Außentemperaturen. Über die Versuchsbedingungen macht er genaue Angaben. Danach erhielten die Versuchsobjekte 3 Stunden vor dem Versuche so viel Futter, als sie innerhalb dieser Zeit konsumieren konnten. Sie kamen an drei aufeinanderfolgenden Tagen bei Temperaturen von 20 bis 25°, −2 bis +3° und +35 bis 40° zur Untersuchung. Die Versuche ergaben das Resultat, daß die Kohlensäureproduktion in wasserdampfgesättigter Luft größer ist als in trockener. Die Steigerung der Ausscheidung erscheint um so bedeutender, je höher die Temperatur; sie betrug in dem einen Falle

bei 23° = 11,8%,
bei 37° = 60,5%;

im anderen Falle: bei 17,5° = 11,8%,
bei 37,5° = 11,2%.

Hielt man die Frage der Abhängigkeit des Stoffumsatzes von der Feuchtigkeit der Luft damit für abgeschlossen, oder versprachen die Resultate wenig Aussicht auf neue Erfolge?

Jedenfalls blieb das Thema seit 1846 unberührt, bis Rubner im Jahre 1890 im Anschluß an seine Studien über den Einfluß der Temperatur auf den Stoffwechsel und über die Beziehungen zwischen atmosphärischer Feuchtigkeit und Wasserdampfabgabe des Organismus die Frage von neuem aufgriff und einer gründlichen Untersuchung unterzog. Bekanntlich war Rubner[2]) bei seinen Untersuchungen über die Bedeutung der Temperatur für den Gasstoffwechsel zu der Anschauung gelangt, daß der Stoffumsatz parallel dem Wärmebedarf des Organismus gehe. Diese Schlußfolgerung stellt eigentlich nur eine Bestätigung der früher schon von Rubner[3]) experimentell bewiesenen Hypothese C. Bergmanns dar, wonach die Kohlensäureproduktion proportional der Oberfläche verlaufe. Denn wenn das entscheidende Moment für die Größe des Stoffumsatzes die verschiedene Abkühlung ist, die verschieden große Tiere von seiten ihrer Oberfläche bei ein und derselben Tempe-

[1]) Lehmann, Verhandl. bei Begründung der Kgl. sächs. Gesellsch. d. Wiss. **1846**, 463.

[2]) Rubner, Gesetze des Energieverbrauchs. Leipzig u. Wien 1902.

[3]) Rubner, Zeitschr. f. Biol. **19**, 1883.

ratur erfahren, so war zu erwarten, daß ein und dasselbe Tier einen mit der Außentemperatur wechselnden Wärmeverlust erleiden und seine Produktion bis zu einem gewissen Grade auf den jeweiligen Verlust einstellen würde. Diese auf rein chemischer Basis fußende Einrichtung zur Aufrechterhaltung der normalen Körpertemperatur hat Rubner als die chemische Wärmeregulation bezeichnet. Nach ihr wird also, wenn die Außentemperatur sinkt, die Wärmeproduktion innerhalb bestimmter Grenzen in dem Maße gesteigert, als der Wärmeverlust durch die Oberfläche zunimmt. Es muß demnach bei sinkender Temperatur Kohlensäureproduktion und Sauerstoffkonsum immer höher, bei steigender immer geringer werden. Die untere physiologische Grenze liegt beim Meerschweinchen bei etwa 0°, die obere bei 30 bis 35°. Zwischen diesen beiden Punkten, den Polen des Bereiches der chemischen Wärmeregulation, besteht eine annähernd umgekehrte Proportionalität zwischen Stoffwechsel und Temperatur. Sinkt die Temperatur unter 0°, so reicht die Oxydation im Tierkörper nicht mehr hin, den Wärmeverlust zu decken, es fällt die Innentemperatur und damit der Stoffumsatz proportional der Temperatur im Rectum. Zwischen 30 und 35° liegt das Minimum der Produktion, an dieser Grenze muß aber auch mit steigender Temperatur der umgebenden Luft die Schwierigkeit der Entwärmung auf anderem Wege abgeglichen werden, und zwar mit Mitteln, die der physikalischen Wärmeregulation zu Gebote stehen. Von dieser Grenze ab kann die Körpertemperatur nur dann auf ihrer normalen Höhe bleiben, wenn durch vermehrte Wasserdampfausscheidung für eine genügende Wärmeabfuhr des Körpers gesorgt ist. Reicht die Wasserdampfabgabe nicht hin, die CO_2-Produktion zu kompensieren, so steigt die Innentemperatur und damit der Stoffumsatz allmählich an.

Nun wissen wir durch die Untersuchungen von Rubner[1]), daß die Wasserdampfausscheidung des Körpers von der Temperatur und dem Feuchtigkeitsgrade der Luft abhängig ist. Sie nimmt, wenn bei gleichbleibender Temperatur der Feuchtigkeitsgehalt der Luft steigt, sehr stark ab; zwischen beiden Größen besteht umgekehrte Proportionalität. Nicht so einfach liegen die Verhältnisse, wenn bei gleichbleibender Wasserdampfspannung die Temperatur variiert wird. Für Meerschweinchen liegt das Minimum der Wasserabgabe nicht bei der tiefsten Temperatur, sondern zwischen 10 und 20°. Läßt man von hier ab die Temperatur auf 0° sinken, so mehrt sich die Wasserabgabe um 41%, und steigert man die Temperatur auf 35°, so nimmt dieselbe um 79% zu.

Ist also bei hoher Temperatur die Luft trocken, so findet die Wasserdampfabgabe vom Organismus leicht statt, und diese vermehrte Ausscheidung verhütet eine Wärmestauung, die in warmer und gleichzeitig hochfeuchter Luft wegen der erschwerten Wasserdampfausscheidung eintreten muß. Bei abfallender Temperatur muß der durch vermehrte Leitung, Strahlung und zum Teil auch durch Wasserabgabe hervorgerufene Wärmeverlust durch erhöhten Stoffumsatz kompensiert werden.

[1]) Rubner, Arch. f. Hygiene 11, 137, 1890.

Alle diese Betrachtungen deuten auf die wichtige Rolle hin, welche die Wasserdampfausscheidung für die Wärmeökonomie des tierischen Organismus einnimmt. Da aber die Wasserdampfabgabe in einem beträchtlichen Abhängigkeitsverhältnis zur Wasserdampfspannung der Luft steht, so erwarten wir auch eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch Schwankungen der atmosphärischen Feuchtigkeit.

Diese Frage wurde von Rubner und seinen Schülern eingehend studiert. Die zunächst an einem Hunde ausgeführten Versuche[1]) erstreckten sich auf die Ermittlung der Eiweiß- und Fettzersetzung bei verschiedenen Feuchtigkeitsgraden der Luft; die Verhältnisse wurden im Hungerzustande, bei Fetternährung und gemischter Fleisch-Fettfütterung festgestellt; gleichzeitig erfolgte in jedem Falle die Bestimmung der Wasserdampfabgabe. Die erste Periode, ein Hungerversuch, dauerte 5 Tage und wurde bei einer Temperatur von 20,2° ausgeführt; Trockenheit und Feuchtigkeit wechselten regelmäßig an aufeinanderfolgenden Tagen. Dabei ergaben sich folgende Mittel für Eiweiß- und Fettzersetzung:

a) Hunger.

	N in Harn u. Kot pro die	Fettkohlenstoff verbrannt pro die	Relative Trockenheit Maximum	Minimum
Trockene Luft	1,04 g	18,0 g	71%	67%
Feuchte „	0,99 g	18,7 g	28%	25%
	+ 0,05 g	— 0,7 g		

In der zweiten Versuchsperiode von ebenfalls 5tägiger Dauer erhielt der Hund täglich 40 g Speck. Die Verhältnisse der Eiweiß- und Fettzersetzung sind aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich:

b) Fettfütterung.

	N in Harn u. Kot pro die	Fettkohlenstoff verbrannt pro die	Relative Trockenheit Maximum	Minimum
Trockene Luft	1,55 g	19,6 g	71%	62%
Feuchte „	1,83 g	18,9 g	52%	44%
	+ 0,28 g	— 0,7 g		

In der dritten Versuchsperiode bei 20,2° erhielt der Hund täglich 80 g Fleisch und 30 g Speck. Die Eiweißzersetzung ergab am ersten Tage mehr Stickstoff als der Hund einführte und setzte sich erst gegen Ende der 10tägigen Periode annähernd ins Gleichgewicht. Das Ergebnis war folgendes:

c) Bei Fütterung mit Fleisch und Fett.

	N-Ausscheidung pro Tag
Bei sehr trockener Luft	3,28 g
„ mittlerer Trockenheit . . .	3,12 g
„ feuchter Luft	3,10 g

[1]) Rubner, Arch. f. Hygiene **11**, 243, 1890.

In einer 4tägigen Versuchsreihe, die bei 10 bis 11° und Fütterung mit 80 g Fleisch und 30 g Speck ausgeführt wurde, wies die Fettverbrennung folgende Mittelwerte auf:

d) Bei Fütterung mit Fleisch und Fett.

	Fettkohlenstoff verbrannt	Relative Trockenheit Maximum	Minimum
Trockene Tage	22,0 g	54%	52%
Feuchte „	22,3 g	17%	11%
	— 0,3 g		

Ein ähnliches Resultat lieferte ein 6tägiger Versuch, der unter gleichen Ernährungsverhältnissen bei 20,2° vorgenommen wurde:

e) Bei Fütterung mit Fleisch und Fett.

	Fettkohlenstoff verbrannt	Relative Trockenheit Maximum	Minimum
Sehr trockene Tage	14,7 g	87%	87%
Mittlere Feuchtigkeit	13,44 g	67%	67%
„ „	14,1 g		
Große „	14,8 g	44%	44%
	+ 0,7 g		

Das Gesamtergebnis war demnach folgendes: Die Eiweißzersetzung ist beim hungernden Tier an feuchten Tagen minimal vermindert, die Fettzersetzung zeigt das umgekehrte Verhältnis. Bei Fetternährung wird an feuchten Tagen etwas mehr Eiweiß abgebaut, aber etwas weniger Fett verbrannt. Bei gemischter Fleisch-Fettfütterung ist die Stickstoffausscheidung an feuchten Tagen etwas vermindert, die Fettverbrennung ergibt für trockene und feuchte Luft dieselben Werte.

Nimmt man alle Werte bei Hunger, Fett, Fleisch und Fett zusammen, so ist an feuchten Tagen die Eiweißzersetzung im Mittel um 0,6% niedriger, die Fettzersetzung um 1,9% höher als an trockenen Tagen. Die Einzelwerte zeigen jedoch relativ große Differenzen; sie betrugen für Eiweiß —5%, +8%, —5%, —0,5%, für Fett +4,8%, +5,2%, +4,1%, —0,7% und —3,6%.

Diese Resultate brachten Rubner zu dem Schlusse, daß die Schwankungen der relativen Feuchtigkeit keinen sicher nachweisbareen Einfluß auf die Eiweiß- und Fettzersetzung haben.

Zu demselben Ergebnis führten die Versuche von Rubner und Lewaschew[1]) am Menschen. Die Versuchspersonen wurden 1 Stunde nach Einnahme eines regelmäßig zusammengesetzten Frühstücks untersucht. Die uns hier interessierenden Daten für die Kohlensäureproduktion und die Wasserdampfabgabe bei wechselnder Temperatur und Feuchtigkeit sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

---

[1]) Rubner und Lewaschew, Arch. f. Hygiene 29, 1.

Kohlensäureproduktion und Wasserdampfabgabe eines Mannes von 58 kg Gewicht, für 1 Stunde berechnet.

Temperatur	Trockene Luft			Feuchte Luft		
	für 1 Std.			für 1 Std.		
Grad	Feuchtigkeit %	CO_2 g	H_2O g	Feuchtigkeit %	CO_2 g	H_2O g
15,0	8	32,34	36,28	89	34,00	8,99
20,4	5	30,00	54,08	82	28,30	15,30
23,0	7	27,9	72,82	84	28,61	18,70
25,4	6	31,7	75,45	81	31,40	23,90
28,9	6	32,4	105,03	—	—	—

Die Tabelle zeigt uns zunächst die schon oben angeführte Tatsache, daß die Wasserdampfausscheidung sowohl in trockener wie in feuchter Luft mit der Temperaturerhöhung zunimmt. Dabei übersteigen die in trockener Luft abgegebenen Mengen jene der Feuchtversuche etwa um das $2^1/_2$fache. Bezüglich der Kohlensäureproduktion stellte sich heraus, daß das Minimum der Ausscheidung bei dem Manne Rubners auf die Temperatur 23° fiel; es ist in trockener Luft etwas niedriger als in feuchter. Das Zahlenbild läßt im übrigen keinen eindeutigen Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf die Kohlensäureproduktion erkennen.

Wolpert[1]) findet in den feuchten Versuchen bei der Person Br. sowohl in der Ruhe als bei Arbeitsleistung konstant mehr Kohlensäure als in den Trockenversuchen. In Versuchen an sich selbst zeigt sich regelmäßig das Gegenteil. Da Wolpert dieselbe Beobachtung schon in früheren Selbstversuchen, die er zu der Arbeit von Rubner und Lewaschew beitrug, gemacht hatte — er produzierte damals bei einer Temperatur von 23,5° und einem Feuchtigkeitsgrad der Luft von 22% 38 g, bei 96% relativer Feuchtigkeit und derselben Temperatur nur 29 g Kohlensäure —, so nimmt er an, daß die Kohlensäureproduktion in verschiedener Weise nach Maßgabe der Körperkonstitution von der Luftfeuchtigkeit beeinflußt werde. Beim Vergleich zwischen den spezifischen Gewichten der verschiedenen Versuchspersonen reifte in ihm die Anschauung, daß die Kohlensäureausscheidung in feuchter Luft nur bei hohem spezifischem Gewichte des Gesamtkörpers größer werde, bei ausgesprochen niedrigem spezifischen Gewicht dagegen geringer.

Die vorliegenden Tatsachen haben die Vermutung eines wesentlichen Einflusses der Luftfeuchtigkeit auf den Stoffwechsel, wie man ihn nach deren Bedeutung für die Wasserdampfabgabe des Körpers erwartet hatte, nicht eindeutig bestätigt. Wenn wir in der vorliegenden Arbeit einen neuen Versuch unternahmen, diese Frage zu klären, so leitete uns dabei die

[1]) Wolpert, Arch. f. Hygiene **36**, 203, 1899.

Erwägung, daß die Verhältnisse vielleicht klarer zutage treten würden, wenn wir absolut feuchte und absolut trockene Luft auf den Organismus einwirken lassen. Eine weitere Veranlassung war dadurch gegeben, daß in den bisherigen Versuchen die der Körperoberfläche gebührende Beachtung unberücksichtigt blieb. Um also auch etwaige Beziehungen zur Körperoberfläche feststellen zu können, zogen wir Tiere von verschiedener Größe zur Untersuchung heran. Die Untersuchung des Einflusses der Wasserdampftension auf den Stoffwechsel wurde auf die Kohlensäureproduktion beschränkt.

Versuchsanordnung.

Die gesamten Versuche gliedern sich in 3 Reihen:

Reihe A enthält die Versuche bei + 20 bis 21,9°;
„ B „ „ „ „ + 5°;
„ C „ „ „ „ + 35°.

Jede Reihe umfaßt 8 Versuche mit je 4 Meerschweinchen; somit kam jedes Tier einmal bei absolut trockener, einmal bei absolut feuchter Luft zum Versuch. Für jede Einzelreihe wurden Tiere von möglichst verschiedenem Gewicht ausgewählt. Bei den Kälteversuchen der Reihe B war diese Anordnung nicht nach Wunsch durchzuführen, da die kleinen Tiere der langen Einwirkung der niedrigen Temperatur entweder während des Versuches oder bald nach demselben zum Opfer fielen. Um den Einfluß der Ernährung bzw. Verdauung auszuschalten, der je nach Qualität und Quantität des Futters verschieden groß ist, gelangten nur Tiere zum Versuch, die, durch eine 22stündige Nahrungsentziehung vorbereitet, sich im Nüchternzustande befanden. Vor Beginn der Hungerperiode und des Respirationsversuches wurde das Gewicht des Tieres festgestellt. Der Versuch erstreckte sich in fast allen Fällen über 8 Stunden. Nach Beendigung desselben wurde das Tier wieder gewogen. Zu dem zweiten Versuche gelangte es erst dann, nachdem es sein früheres Gewicht wieder erreicht hatte. Zur Ermittlung der Körperoberfläche wurde das Meerschweinchen nach dem zweiten Versuche mit Chloroform getötet, das rasierte und abzogene Fell auf Papier aufgetragen und mittels Polarplanimeters gemessen.

An dieser Stelle mag noch darauf hingewiesen werden, daß sich die Tiere ausnahmslos fast während der ganzen Versuchsdauer ruhig verhielten. Nur in der ersten Viertelstunde gebärden sie sich, an die etwas befremdende Situation nicht gewöhnt, etwas lebhafter, um dann bald ruhig zu werden. Daß sie während der langen Dauer des Versuches hin und wieder ihre Stellung wechseln, bedarf als selbstverständlich kaum einer besonderen Erwähnung.

Die Versuche wurden mit dem von dem einen von uns konstruierten Respirationsapparate ausgeführt. Derselbe ist in Band 42, Heft 4 dieser Zeitschrift beschrieben, und verweisen wir bezüglich der Details des Apparates auf die betreffende Abhandlung. Zur Ergänzung der dort beschriebenen Anordnung haben wir hier nur noch über jene Vorrichtungen zu berichten, deren wir uns zur Trocknung und Wasserdampfsättigung der Luft bedienten. Um die Luft vor ihrem Eintritt in die Erwärmungs- bzw. Abkühlungsapparatur zu trocknen, wurde sie nach der Passage durch die Gasuhr durch zwei mit konz. Schwefelsäure beschickte Waschflaschen und dann durch zwei bzw. drei große, mit granuliertem Chlorcalcium beschickte U-Röhren geführt. Damit die so getrocknete Luft ihren Zustand beibehielt, war der ganze Raum zwischen den Trockenapparaten und dem CO_2-Absorptionsapparat vor dem Versuch vollkommen ausgetrocknet worden. Den von dem Tiere abgegebenen Wasserdampf suchten wir dadurch möglichst unschädlich zu machen, daß wir den Boden des Rezipienten mit oxydfreiem Chlorcalcium bedeckten. Auf dieser Chlorcalciumunterlage ruhte im Versuch eine durchlöcherte Porzellanplatte, auf der das Tier saß. — Die Sättigung mit Wasserdampf wurde dadurch erzielt, daß wir die Luft nach dem Durchgang durch die Erwärmungs- bzw. Kühlungsapparate mehrere Waschflaschen mit Wasser passieren ließen, das in den Wärmeversuchen erhitzt wurde. Außerdem wurde der Boden der Thermoregulatorflasche und des Respirationsraumes mit einer dünnen Wasserschicht bedeckt. Um uns jederzeit von dem Wasserdampfgehalt der Luft überzeugen zu können, schalteten wir zwischen Thermoregulatorgefäß und Rezipienten ein empfindliches Haarhygrometer ein.

Die von dem Tiere ausgeatmete Kohlensäure wird von dem Luftstrom mitgerissen und in dem mit 50%iger Kali-

lauge gefüllten Absorptionsapparat zurückgehalten. Die Menge der zu einem Versuche verwendeten Lauge betrug 300 ccm. Sie wurde nach dem Versuche in einen Literkolben entleert und der Apparat durch wiederholtes Nachspülen mit destilliertem Wasser so lange ausgewaschen, bis das Volumen 1000 ccm betrug. Anfangs- und Endlauge wurden auf ihren CO_2-Gehalt nach der Methode von Fresenius-Claßen untersucht.

In den nun folgenden Tabellen sind die Ergebnisse unserer Versuche in Kürze zusammengefaßt.

Jede der 3 folgenden Doppeltabellen enthält die Versuche, nach der Größe der Tiere geordnet.

Ein Vergleich der Werte der Kohlensäureproduktion in Tabelle A, B und C zeigt zunächst den bekannten Einfluß der Temperatur auf die Stoffzersetzung, demzufolge die Produktion mit fallender Temperatur zunimmt. Diese Zunahme beträgt im Mittel für den Temperaturabfall 21° auf 5°, in trockener Luft 76,5%, in feuchter Luft 82,8%. Bei Erhöhung der Temperatur von 21° auf 35° geht die CO_2-Produktion in den Trockenversuchen um 18,7% herunter und steigt in den Feuchtigkeitsversuchen um 6,1%.

Wir begegnen hier einer sehr auffälligen Erscheinung, die schon darauf hindeutet, daß die Wasserdampftension der Luft zwischen den beiden letztgenannten Temperaturen eine ausschlaggebende Rolle spielen muß. Aus dem folgenden wird ersichtlich, warum der zwischen den Trocken- und Feuchtigkeitsversuchen von + 5° und 21° bestehende Parallelismus in der CO_2-Produktion beim Übergang zur höheren Temperatur verschwindet.

Vergleichen wir die in den Trocken- und Feuchtigkeitsversuchen ausgeschiedenen Kohlensäuremengen für je eine bestimmte Temperatur, so lassen die vorhandenen Differenzen deutlich den Einfluß der Dampftension auf den Stoffumsatz erkennen; die Beeinflussung trat bei den drei gewählten Temperaturen in die Erscheinung.

Wenn wir in der Versuchsreihe A von den Daten des Tieres 4, das annähernde Gleichproduktion in feuchter und trockener Luft aufwies, abstrahieren, so ergeben die Zahlen das eindeutige Resultat, daß bei mittlerer Temperatur von 20,0 bis 21,9° in trockener Luft mehr Kohlensäure ausge-

Versuchsreihe A. Versuchstemperatur 20 bis 21,9°.

Tier-Nummer	Relative Feuchtigkeit %	Datum des Versuchs 1911	Versuchsdauer Std.	Versuchstemperatur °C	Gewicht des Tieres vor dem Hungern g	Gehungert Std.	Gewicht des Tieres vor dem Versuche g	Gewicht des Tieres nach d. Versuche g	Mittelgewicht des Tieres g	Gewichtsverlust während des Versuchs g	Oberfläche qdm	Rectaltemperatur vor dem Versuche °C	Rectaltemperatur nach d. Versuche °C
1	0	25. VIII.	7	21,8	674	22	617	586	601	31	6,78	—	—
1	100	29. VIII.	7	21,9	622	23	591	575	583	16	6,78	—	—
4	0	28. VIII.	8	21,2	630	22	575	561	568	14	6,91	—	—
4	100	2. IX.	8	20,3	627	21	569	555	562	14	6,91	—	—
2	0	26. VIII.	8	20,4	609	21	531	516	524	15	6,54	—	—
2	100	30. VIII.	8	21,3	592	23	500	486	493	14	6,54	—	—
16	0	19. X.	8	20,0	480	21	457	446	452	11	6,22	36,7	36,2
16	100	26. X.	8	20,0	477	24	422	412	417	10	6,22	35,8	36,8

Versuchsreihe A (Fortsetzung). Temp. 20 bis 21,9°.

Tier-Nr.	Relative Feuchtigkeit %	Produziert CO_2 in 8 Std. g	Produziert CO_2 in 8 Std. l	CO_2 pro Std. u. 100 g g	CO_2 pro Std. u. 100 g ccm	CO_2 pro Std. u. qdm g	CO_2 pro Std. u. qdm ccm
1	0	5,685	2,902	0,1176	60,0	0,1048	53,5
1	100	4,9966	2,550	0,107	55,0	0,092	47,0
4	0	4,452	2,272	0,0980	50,0	0,0805	41,1
4	100	4,586	2,340	0,1019	52,0	0,0829	42,3
2	0	4,806	2,453	0,1146	58,5	0,0917	47,0
2	100	4,414	2,253	0,1119	57,0	0,0843	43,0
16	0	6,0588	3,092	0,1675	85,0	0,1217	62,1
16	100	5,0648	2,585	0,1519	77,0	0,1019	52,0

Versuchsreihe B. Versuchstemperatur + 5°.

Tier-Nummer	Relative Feuchtigkeit %	Datum des Versuchs 1911	Versuchsdauer Std.	Versuchstemperatur °C	Gewicht des Tieres vor dem Hungern g	Gehungert Std.	Gewicht des Tieres vor dem Versuche g	Gewicht des Tieres nach d. Versuche g	Mittelgewicht des Tieres g	Gewichtsverlust während des Versuchs g	Oberfläche qdm	Rectaltemperatur vor dem Versuche °C	Rectaltemperatur nach d. Versuche °C
12	0	12. X.	8	5	772	21	740	718	729	22	7,99	37,4	35,2
12	100	20. X.	8	5	793	23	699	677	688	22	7,99	36,7	36,3
4	0	12. IX.	8	5	605	22	541	518	530	23	6,91	—	—
4	100	20. IX.	8	5	629	22	564	544	554	20	6,91	—	—
2	0	9. IX.	8	5	571	22	502	484	493	18	6,54	—	—
2	100	19. IX.	8	5	581	22	509	490	500	19	6,54	—	—
13	0	13. X.	8	5	565	22	526	505	516	21	6,56	36,3	36,3
13	100	21. X.	8	5	571	22	493	473	483	20	6,56	37,5	36,3

Versuchsreihe B (Fortsetzung). Temp. + 5°.

Tier-Nr.	Relative Feuchtigkeit %	Produziert CO_2 in 8 Std. g	l	CO_2 pro Std. u. 100 g g	ccm	CO_2 pro Std. u. qdm g	ccm
12	0	11,9028	6,075	0,2040	104,0	0,1861	95,0
12	100	11,3848	5,810	0,2067	105,5	0,1781	91,0
4	0	9,408	4,801	0,2218	113,2	0,1701	86,8
4	100	8,226	4,198	0,1856	95,0	0,1485	75,8
2	0	8,738	4,459	0,2214	113,0	0,1669	85,2
2	100	8,754	4,468	0,2189	112,0	0,1673	85,4
13	0	9,4488	4,822	0,2289	117,0	0,1801	92,0
13	100	8,6848	4,432	0,2245	114,6	0,1654	84,4

Versuchsreihe C.

Versuchstemperatur 35°.

Tier-Nummer	Relative Feuchtigkeit %	Datum des Versuchs 1911	Versuchsdauer Std.	Versuchstemperatur °C	Gewicht des Tieres vor dem Hungern g	Gehungert Std.	Gewicht des Tieres vor dem Versuche g	Gewicht des Tieres nach d. Versuche g	Mittelgewicht des Tieres g	Gewichtsverlust während des Versuchs g	Oberfläche qdm	Rectaltemperatur vor dem Versuche °C	Rectaltemperatur nach d. Versuche °C
11	0	11. X.	8	35	691	22	634	615	625	19	7,07	37,2	39,4
11	100	25. X.	8	35	692	21	630	614	622	16	7,07	37,0	38,5
10	0	10. X.	8	35	638	22	586	564	575	22	6,75	—	—
10	100	30. IX.	8	35	638	21	591	569	580	22	6,75	—	—
9	0	9. X.	8	35	492	23	442	426	434	16	6,11	—	—
9	100	29. IX.	7⅔	35	507	22	447	431	439	16	6,11	—	—
8	0	6. X.	8	35	320	26	282	273	278	9	4,68	—	—
8	100	28. IX.	8	35	345	22	292	284	288	8	4,68	—	—

Versuchsreihe C (Fortsetzung). Temp. + 35°.

Tier-Nr.	Relative Feuchtigkeit %	Produziert CO_2 in 8 Std. g	l	CO_2 pro Std. u. 100 g g	ccm	CO_2 pro Std. u. qdm g	ccm
11	0	5,280	2,695	0,1056	54,0	0,0935	47,7
11	100	6,2808	3,206	0,1262	64,4	0,1111	56,7
10	0	4,772	2,435	0,1037	53,0	0,0884	45,1
10	100	5,942	3,0325	0,1279	65,3	0,1099	56,1
9	0	3,768	1,923	0,1085	55,4	0,077	39,3
9	100	4,299	2,194	0,1223	62,4	0,0878	45,0
8	0	2,4958	1,274	0,1125	57,4	0,0666	34,0
8	100	2,762	1,410	0,1199	61,2	0,0737	37,6

schieden wird als in feuchter Luft. So produzierte Tier 1 bei absoluter Trockenheit pro Quadratdezimeter und Stunde 53,5 ccm, bei absoluter Feuchtigkeit 47 ccm CO_2.

Tier 2 hatte pro Quadratdezimeter und Stunde in feuchter Luft 4 ccm, und Tier 16 10,1 ccm CO_2 weniger ausgeschieden als bei Trockenheit. Drücken wir diese Zunahme in Prozenten der Gesamtproduktion aus, so ergibt sich

für Tier 1 4 2 16 eine Mehrproduktion an Kohlensäure von + 13,8 — 2,8 + 9,3 + 19,4

in trockener Luft gegenüber feuchter.

Ähnlich sind die Verhältnisse bei der Versuchsreihe B ($t = 5°$). Auch hier ist mit Ausnahme der Versuche von Tier 2, in denen sich vollständige Übereinstimmung der Zahlen herausstellte, eine vermehrte Kohlensäureproduktion in den Trockenheitsversuchen zu verzeichnen.

Tier 12 produzierte in trockener Luft pro Quadratdezimeter und Stunde 95 ccm, in feuchter Luft pro Quadratdezimeter und Stunde 91 ccm.

Bei Tier 4 betrug die Mehrausscheidung 11 ccm, und bei Tier 13 7,6 ccm CO_2.

Diese Zahlen entsprechen einem prozentualen Zuwachs

für Tier 12 2 4 13

von + 4,4, — 0,2, + 14,5, + 9,0% für trockene Luft.

Versuchsreihe C zeigt das umgekehrte Verhältnis. Danach wird bei hohen Temperaturen in feuchter Luft regelmäßig mehr Kohlensäure produziert als in trockener Luft. Der Zuwachs für feuchte Luft betrug:

bei Tier 11: 9,1 ccm, entsprechend 15,9%,
„ „ 10: 11,0 „ „ 19,6%,
„ „ 9: 5,7 „ „ 12,6%,
„ „ 8: 3,6 „ „ 9,5%.

Die Resultate unserer Versuche stehen demnach in Widerspruch mit den Befunden Rubners. Nach den oben gemachten Mitteilungen hat Rubner bei seinen am Hunde vorgenommenen Versuchen keinen sicher nachweisbaren Einfluß der Schwankungen der Luftfeuchtigkeit auf die Eiweiß- und Fettzersetzung im tierischen Organismus erkennen können. Daß aber Rubner

auf Grund seiner Erfahrungen über das Verhältnis zwischen Luftfeuchtigkeit und Wasserdampfausscheidung des Körpers einen Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf den Stoffwechsel erwartet hatte, geht aus den einleitenden Worten zu seinem Artikel: „Stoffzersetzung und Schwankungen der Luftfeuchtigkeit“[1]) hervor: „Man könnte sich die Beeinflussung als eine auf wärmeregulatorischem Wege zustande kommende denken. Wenn bei Zunahme der Luftfeuchtigkeit die Menge des durch Verdunstung abgegebenen Wassers eines Organismus geringer wird, so sollte man erwarten, daß nun die Kohlensäureproduktion, die Sauerstoffaufnahme und die Fettzersetzung herabgesetzt werden, weil eben der Organismus weniger Wärme verliert als bei etwas trockenerer Luft, bei der die Wasserdampfabgabe größer ist.“

Da Annahme und Resultat sich nicht deckten, suchte sich Rubner durch Erforschung der quantitativen Beziehungen zwischen den durch Wasserverdampfung und den durch Strahlung und Leitung abgegebenen Wärmemengen bei verschiedenen Feuchtigkeitsgraden Aufklärung zu verschaffen und fand, daß in demselben Maße, in dem bei steigender Luftfeuchtigkeit die Wasserdampfausscheidung abnimmt, die Wärmeleitung und Strahlung eine Steigerung erfährt.

Dadurch würde die Wirkung der Luftfeuchtigkeit auf den Stoffwechsel ausgeschaltet, indem die bei zunehmender Feuchtigkeit verminderte Wasserabgabe durch eine äquivalente Erhöhung der Wärmeleitung und Strahlung ersetzt wird.

Es läßt sich nach diesen Feststellungen Rubners schwer entscheiden, worauf die Inkongruenz seiner und unserer Befunde zurückzuführen ist. Am nächsten dürfte wohl die Vermutung liegen, daß die Unterschiede auf der Verschiedenheit der Versuchsbedingungen basieren. Tatsächlich hat Rubner bei seinen Tierversuchen Feuchtigkeitsgrade zur Anwendung gebracht, die im Höchstfalle nur 46% voneinander differierten.

Eine Erklärung für die Erscheinungen, wie wir sie bei unseren Versuchen beobachtet haben, ist nach alledem, was wir über die Beziehungen zwischen Luftfeuchtigkeit und Wasserdampfabgabe des Körpers gesagt haben, unschwer zu erbringen.

---

[1]) Rubner, Arch. f. Hygiene **11**, 245, 1890.

Wenn bei mittlerer (21°) oder niedriger Temperatur (5°) die Luft mit Feuchtigkeit gesättigt und dadurch die Wasserdampfabgabe des Körpers herabgedrückt ist, so wird der Stoffumsatz geringer, weil der Organismus dann weniger Wärme verliert als in trockener Luft, in welcher der durch lebhaftere Wasserverdunstung bewirkte Wärmeverlust größer ist. Es muß demnach mit zunehmender Feuchtigkeit bei den genannten Temperaturen eine Verminderung, mit zunehmender Trockenheit eine Vermehrung der Kohlensäureproduktion erfolgen.

Steigt hingegen die Luftfeuchtigkeit bei der hohen Temperatur von 35°, bei welcher der Wärmeverlust durch Strahlung und Leitung so gut wie aufgehoben und die physikalische Wärmeregulation auf die Wasserdampfausscheidung angewiesen ist, bis zur Sättigung an, so muß es bei der durch die Feuchtigkeit erschwerten Wasserdampfabgabe zu einer Überwärmung des Körpers kommen, die eine Erhöhung des Stoffumsatzes im Gefolge hat.

Die regelmäßige Feststellung der Rektaltemperatur vor und nach jedem Versuche hätte zweifellos eine Bestätigung der vorliegenden Tatsachen abgegeben; die Anzahl der wirklich ermittelten Temperaturdaten ist zu gering, als daß wir sie zur Kritik heranziehen möchten.

Zum Schlusse bleibt uns noch die Frage zu erörtern, ob die Veränderung der Kohlensäureproduktion durch den Wechsel der Luftfeuchtigkeit eine Beziehung zur Körperoberfläche erkennen läßt.

Wenn man in der Versuchsreihe C den prozentualen Zuwachs dem Körpergewicht der Tiere gegenüberstellt, so gewinnt man die Überzeugung, daß die Vermehrung der Kohlensäureproduktion in feuchter Luft eine mit Zunahme des Körpergewichtes einhergehende Steigerung erfährt. Kleinere Tiere haben aber im Verhältnis zu ihrem Gewicht eine größere Oberfläche und sind deshalb zur Wärmeabgabe durch dieselbe in einem höheren Grade befähigt als größere Tiere. Dieser Vorzug gibt sich dadurch zu erkennen, daß kleinere Tiere in warmer, hochfeuchter Luft weniger leicht mit Hyperthermie reagieren und deshalb eine geringere Erhöhung des Stoffumsatzes zeigen als größere Tiere.

Bei der niedrigen Temperatur von + 5° machen sich anscheinend entgegengesetzte Unterschiede geltend. Hier ist der prozentuale Zuwachs an Kohlensäure in trockener Luft bei den kleineren Tieren beträchtlicher als bei den größeren. Darnach dürfte die Wärmeabgabe kleinerer Tiere beim Übergang von feuchter zu trockener Luft in einem größeren Verhältnis zunehmen als bei größeren Tieren und die stärkere Abkühlung als Ursache der mehr gesteigerten CO_2-Produktion anzusehen sein.

Ähnlich, aber weniger überzeugend tritt uns diese Beziehung in den Werten der Kohlensäureproduktion bei der mittleren Temperatur von 21° entgegen.

Zum Schlusse sei es uns gestattet, Herrn Prof. Dr. Schloßmann für das Interesse, das er der Ausführung vorliegender Arbeit entgegengebracht, unseren wärmsten Dank auszusprechen.

Die qualitative und quantitative Bestimmung flüchtiger Fettsäuren mittels der Vakuum-Dampfdestillation[1]).

Von

F. Edelstein und **F. v. Csonka.**

(Aus dem Kaiserin Auguste Victoria-Haus zur Bekämpfung der Säuglingssterblichkeit im Deutschen Reiche.)

(Eingegangen am 22. Mai 1912.)

Die Methode der Vakuum-Dampfdestillation hat vor anderen den Vorteil, daß sie es ermöglicht, wenn tierische Flüssigkeiten oder Materialien zur Untersuchung vorliegen, eine Zersetzung der Eiweißsubstanzen und damit eine Neubildung flüchtiger Fettsäuren zu umgehen.

Ferner ist mit dieser Methode eine so gut wie quantitative Trennung der Milchsäure von den flüchtigen Fettsäuren zu erreichen.

Durch Titration der Destillate mit einer $^n/_{10}$-Natronlauge wird der Gesamtgehalt an freien und gebundenen flüchtigen Fettsäuren festgestellt.

So wichtig nun die Bestimmung dieses Gesamtgehaltes speziell bei einer Reihe von Vergleichsuntersuchungen ist, so sagt sie doch über die Qualität und die Verteilung der ein-

---

[1]) E. Welde, diese Zeitschr. 28, 504, 1910. — Bahrdt, Edelstein, Langstein, Welde, Zeitschr. f. Kinderheilk. 1, 139, 1910. — Edelstein, Welde, Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 152, 1911.

zelnen flüchtigen Fettsäuren nichts aus. Zum Zwecke der qualitativen und quantitativen Bestimmung der einzelnen Fettsäuren muß man selbstverständlich das Destillat weiter verarbeiten.

Bei den für uns in Betracht kommenden Untersuchungen hatten wir es mit verhältnismäßig kleinen Mengen von Fettsäuren zu tun. An eine Isolierung mittels fraktionierter Destillation war also nicht zu denken. Es handelt sich ja um Mengen von etwa 0,06 bis 0,3 g Fettsäure.

Die Anwendung der sonst üblichen fraktionierten Fällung der Silbersalze war bei diesen kleinen Mengen auch nicht ohne weiteres aussichtsreich.

Aber auch für größere Quantitäten ist das Verfahren der fraktionierten Silbersalzfällung unseres Wissens nirgends genau beschrieben; speziell über die Ausbeute sind in der Literatur keine Angaben zu finden.

Wir haben uns Lösungen von bekanntem Gehalt hergestellt, und zwar von Essigsäure, von Essigsäure und Buttersäure und schließlich von Capron-, Capryl-, Butter- und Essigsäure. Die Lösungen wurden teils direkt der fraktionierten Fällung unterworfen, teils erst in starker Verdünnung im Vakuumdampf destilliert und das Destillat wurde dann fraktioniert gefällt. Auf diese Weise konnten wir erkennen, mit welchen Verlusten man im Verlauf der ganzen Bestimmung zu rechnen hat.

Vom Destillat wurde ein aliquoter Teil (100 ccm) gegen Phenolphthalein mit $^n/_{10}$-NaOH titritrt und auf die ganze Menge umgerechnet. Dann wurde mit der erforderlichen Anzahl Kubikzentimeter $^n/_{10}$-NaOH das ganze Destillat neutralisiert, auf ein ganz kleines Volumen eingedampft, so daß etwa die Konzentration einer $^n/_2$-Lösung vorlag und schließlich mit einer n-Silbernitratlösung (17%ig) fraktioniert gefällt.

Im Laufe der Untersuchung hat sich folgendes herausgestellt: Filtriert man auf vorher getrockneten und gewogenen Filtern und verglüht dann (nach vorangegangenem Trocknen und Wägen bis zur Konstanz) die Silbersalze + Filterpapier, so hat man damit zwar scheinbar die besten Bedingungen für eine quantitative Ausbeute geschaffen, muß aber dabei einige

Nachteile berücksichtigen. Es bleibt im Papier ein kleiner Rest von Feuchtigkeit zurück, der in vacuo über Schwefelsäure nicht weggeht. Wir haben nun zwar das Trocknen bei 40 bis 50° in vacuo vorgenommen, doch auch dabei bleibt ein Feuchtigkeitsrest zurück, der nicht nur höhere Ausbeuten vortäuscht, sondern auch die Prozentzahl des Silbers herunterdrückt, was die qualitative Seite der Bestimmung beeinträchtigt.

Liegt eine Mischung verschiedener flüchtiger Fettsäuren vor, so fällt trotz fraktionierter Fällung ein Gemenge verschiedener Fettsäuren aus. Dieses Silbersalzgemenge schließt außerdem den nichtgefällten Anteil des Natriumsalzes ein. Daß dadurch die Silberzahlen falsche Werte liefern und die Ausbeute um ein Beträchtliches sinkt, ist ohne weiteres klar. Man muß also jede Fraktion auswaschen. Wir haben dies mit absolutem resp. verdünntem Alkohol getan. Dadurch kommt zwar eine immer steigende Verdünnung zustande, doch kommt dabei der Umstand zugute, daß bei einer bestimmten Konzentration und einer Anreicherung mit $AgNO_3$ die essigsauren Silbersalze in Alkohol fast unlöslich sind.

Wir haben außerdem das einfache Filtrieren aufgegeben und uns des Saugens bedient. Das Filterchen wurde auf einen Platinkonus aufgesetzt und das Bechergläschen zum Aufsaugen des Filtrates, mit einem durchlochten Uhrglas bedeckt, unter eine an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Glasglocke gestellt. Diese Arbeitsweise[1]) ermöglicht ein exaktes quantitatives Arbeiten. Durch das Saugen wird einerseits eine vollkommene Trennung von Niederschlag und Lösung erreicht, andererseits bleibt so viel weniger im Papier an Feuchtigkeit zurück.

Ein letzter, sehr geringer Rest von Feuchtigkeit ist trotz Saugens und Trocknens bei 40 bis 50° in vacuo sehr schwer

---

[1]) Das einfachste wäre natürlich, sich des Goochtiegels zu bedienen. Nun hält aber das Asbest in viel höheren Maße die Feuchtigkeit zurück, und das Trocknen bis zur Gewichtskonstanz ist, wenn man nicht über 130° gehen darf, noch viel unvollständiger. Der Goochtiegel hat außerdem noch den Nachteil, daß ein vollkommenes Verglühen des Silbersalzes sehr lange dauert, weil man den Goochtiegel nicht unmittelbar erhitzen darf.

wegzubringen. Dieser Rest ist leicht zu berechnen. Man trocknet das Filter + Ag-Salz bis zur Konstanz, schabt, möglichst quantitativ, das Silbersalz in einen vorher gewogenen Tiegel ab, wägt und verglüht. So stellt man die Prozentzahl Ag des Salzes fest. Das Filterchen mit dem Rest des Salzes wird + Papier für sich verglüht und aus dem Ag-Gewicht wieder die Prozentzahl berechnet. Stimmen die Prozentzahlen nicht überein, so kann daran nur die im Papier befindliche Feuchtigkeit schuld sein. Wieviel diese in jedem besonderen Falle beträgt, ist rechnerisch leicht zu ermitteln. Sie ist übrigens sehr schwankend und beträgt etwa 3 bis 10 mg. Zieht man diese Zahl von der ganzen Silbersalzmenge der betreffenden Fraktion ab, so bekommt man eine richtige Ausbeute.

Um das lästige Rechnen, Trocknen und Wägen der Filter usw. zu vermeiden, haben wir einen anderen Weg eingeschlagen, der uns von der Feuchtigkeit des Papiers völlig unabhängig machte, und bei dem ein Trocknen und Wägen der Filter unnötig ist.

Man filtriert unter Saugen die Silbersalze auf nicht gewogenen und ungetrockneten Filtern ab und trocknet nun Filter + Silbersalz 1 bis 2 Tage im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure. Nun schabt man die Hauptmenge der Salze in gewogene Tiegel, wägt Tiegel + Salz ab und trocknet bis zur Gewichtskonstanz in vacuo über P_2O_5 bei einer 40 bis 50° nicht übersteigenden Temperatur. In einigen Stunden ist die Konstanz erreicht. Man verbrennt die Silbersalze, wägt das Ag und berechnet daraus die Prozentzahl Silber. Andererseits verbrennt man das Papier + Silbersalzrest und wägt das zurückbleibende Silber. Unter der selbstverständlichen Voraussetzung, daß der Silbersalzrest genau dieselbe Prozentmenge Silber enthält wie die Hauptmenge, kann man nun aus dem Gewicht des bei der Verbrennung des Silbersalzrestes zurückgebliebenen Silbers die ihm entsprechende Silbersalzmenge berechnen; soll z. B. die Hauptmenge A Silbersalz B Gramm Silber geliefert haben, bei der Verbrennung des Silbersalzrestes (+ Papier verglüht) soll b Gramm Silber zurückgeblieben sein, dann ist $B : A = b : x$. Addiert man die beiden Silbersalzmengen, so hat man in völlig einwandfreier Weise die Gesamtmenge des Silbersalzes der betreffenden Fraktion festgestellt.

Wie bereits erwähnt, ist eine vollständige Trennung durch die fraktionierte Fällung nicht zu erreichen. Es fallen Gemenge von Fettsäuren aus, und zwar von zwei „benachbarten" Säuren, deren Löslichkeit mit steigendem *C*-Gehalt in der homologen Reihe abnimmt. Es wird also z. B. Essigsäure einerseits mit Ameisensäure, andererseits mit Buttersäure ausfallen, die Buttersäure wird wieder einerseits mit Essigsäure, andererseits mit Capronsäure gemischt zur Ausscheidung gelangen.

Berechnet man nun aus solch einem Silbersalz die entsprechende Menge Säure, so ist das nicht ganz richtig. Nehmen wir z. B. an, wir hätten gefunden 63% Ag, berechnet 64,7%. Das, was wir als Essigsäure annehmen, ist noch ein Gemisch von (dem Hauptanteil nach) Essigsäure und von wenig Buttersäure. Die Fehler sind zwar sehr klein, weil der in einem Silbersalz nicht mit berechnete Anteil an Buttersäure im anderen wieder zum Ausgleich kommt, wo trotz einer kleinen Beimengung von Essigsäure das Ganze als Buttersäure gerechnet wird. Die Säuremengen kompensieren sich also gegenseitig. Wo es sich aber um kleine Quantitäten handelt, fallen auch diese an sich kleinen Fehler in die Wagschale. Wir haben diese Fehler eliminiert, indem wir den Faktor, resp. die Faktoren, berechneten, mit denen man die Silbersalzmengen multiplizieren muß, um den Säureanteil jeder Säure für sich ermitteln zu können. Die Berechnung ist sehr einfach. Die Differenz z. B. zwischen der Prozentzahl Ag der Essigsäure und Buttersäure (essigsaures Silber 64,7% Ag, buttersaures Silber 55,4% Ag) beträgt 9,3. Hat man nun z. B. ein Salz von 59,5% Ag, so ist die Differenz zwischen dieser Prozentzahl und der Prozentzahl Ag des buttersauren Silbers 4,1. Dividiert man (nach der Proportion $1 : 9{,}3 = x : 4{,}1$) $4{,}1 : 9{,}3 = 0{,}4408$, so bekommt man den Faktor, mit dem man die Menge des betreffenden Ag-Salzes zu multiplizieren braucht, um den Anteil des essigsauren Ag zu bekommen. Diese Zahl, von der ganzen Silbersalzmenge subtrahiert, liefert das entsprechende buttersaure Silbersalz.

Wir haben für Essigsäure — Buttersäure-Ag-Salz diesen Faktor für sehr viele Prozentzahlen berechnet und stellen es hier in einer Tabelle zusammen.

Tabelle

zur Ermittelung des Faktors, mit dem man die Menge des Silbersalzes multiplizieren muß, um die ihm entsprechende Menge Silbersalz reiner Essigsäure zu erhalten.

Silbersalz lieferte statt 64,7 (berechnet)			
64,4% Ag	0,976	60,7% Ag	0,570
64,3% „	0,957	60,5% „	0,550
64,26% „	0,9526	60,2% „	0,520
64,2% „	0,946	60,0% „	0,494
64,0% „	0,925	59,7% „	0,463
63,75% „	0,8978	59,5% „	0,441
63,7% „	0,892	59,2% „	0,409
63,5% „	0,871	59,0% „	0,387
63,2% „	0,840	58,7% „	0,355
63,0% „	0,820	58,5% „	0,333
62,85% „	0,801	58,2% „	0,301
62,7% „	0,786	58,0% „	0,280
62,5% „	0,763	57,7% „	0,250
62,45% „	0,758	57,5% „	0,230
62,31% „	0,749	57,2% „	0,194
62,2% „	0,732	57,0% „	0,172
62,0% „	0,720	56,7% „	0,140
61,7% „	0,679	56,5% „	0,120
61,5% „	0,656	56,2% „	0,086
61,42% „	0,6473	56,1% „	0,0752
61,2% „	0,625	56,0% „	0,064
61,0% „	0,602	55,7% „	0,032
60,75% „	0,5559	55,5% „	0,010

Genau so kann man den Faktor für die Silbersalze anderer Säuren leicht berechnen unter der Berücksichtigung, daß die Differenz zwischen

Essigsaures Ag — Ameisensaures Ag = 5,9
Buttersaures Ag — Capronsaures Ag = 7,0
Capronsaures Ag — Caprylsaures Ag = 5,4
Caprylsaures Ag — Caprinsaures Ag = 4,3

beträgt.

Bevor wir unsere Versuche hier anführen, wollen wir nochmals die Arbeitsweise zusammenfassend angeben.

Methodik.

Eine beliebige Menge, z. B. von Milch (100 bis 250 ccm), wird in Vakuumdampf[1]) bei 60° unter Zusatz von 7,5 ccm Phos-

[1]) Die Ausführung der Vakuum-Dampfdestillation siehe bei Welde, diese Zeitschr. 28, 504, 1910.

phorsäure ($D = 1{,}12$) destilliert. Handelt es sich um eine Untersuchung im Stuhl, so werden von frischem, feuchtem Kot[1]) z. B. 30 g in Wasser gut suspendiert und erst dann der Destillation unterworfen. Man destilliert bis zur Erschöpfung, d. h. so lange, bis das letzte Destillat nicht mehr als 1 ccm $^n/_{10}$-NaOH verbraucht[2]). Vor der Titration muß das Destillat auf Chlor und Phosphorsäure untersucht werden[3]). Man merkt sich, wieviel in den aliquoten Teilen an Natronlauge verbraucht wurde (die betreffende Anzahl Kubikzentimeter muß bei der Ausbeuteberechnung berücksichtigt werden), rechnet auf das Gesamtdestillat um und neutralisiert das Ganze mit der erforderlichen Anzahl Kubikzentimeter $^n/_{10}$-NaOH. Infolge kleiner Titrationsfehler (Empfindlichkeit der Kohlensäure gegenüber Phenolphthalein), die sich durch das Multiplizieren noch vergrößern, ist die aus dem aliquoten Teil aufs Ganze umgerechnete Zahl der Kubikzentimeter etwas zu hoch. Man tut gut, etwas weniger zur Neutralisation anzuwenden. Wurden also z. B. 42 ccm berechnet, so gebe man nur 40 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge hinzu. Nun wird auf etwa 100 ccm eingeengt, durch ein kleines Filter in ein kleines Becherglas filtriert, mit heißem Wasser nachgewaschen und die Lösung weiter im Becherglase auf dem Wasserbade bis auf ein Volumen von etwa 20 bis 30 ccm eingedampft. Jetzt wird mit einer n-Silbernitratlösung fraktioniert gefällt. Man gibt zuerst 0,3 bis 0,5 ccm Silbernitrat zu; löst sich der ausfallende (weiße)[4]) Niederschlag beim Umschütteln nicht

---

[1]) Zur genauen Berechnung muß man natürlich nebenbei die Trockensubstanz bestimmen.

[2]) Berechnet aus der Titration eines aliquoten Teils; jedes Destillat soll ca. 800 bis 1000 ccm betragen.

[3]) Die Anwesenheit sowohl von Chlor als von Phosphorsäure würde natürlich die ganze Bestimmung unmöglich machen. Findet man beide oder eins von beiden, so muß das betreffende Destillat nochmals destilliert werden. Wendet man einige Vorsicht beim Destillieren an, so ist leicht zu vermeiden, daß auch nur eine Spur der zugesetzten Phosphorsäure mechanisch mitgerissen wird.

[4]) Ist der Niederschlag dunkel, so war die Lösung etwas alkalisch und es fällt Silberoxyd mit aus. Man kann diese Fraktion noch verwenden, wenn man mit heißem Wasser den Niederschlag auswäscht (Ag_2O darin unlöslich) und die Lösung mit dem übrigen Filtrat vereinigt.

auf, so liegen die schwerer löslichen Fettsäuren vor (Capryl-, Capronsäure), und man tut in diesem Falle gut, die ersten zwei Fraktionen mit verdünntem Alkohol nachzuwaschen. Der Niederschlag wird auf einem kleinen, nicht getrockneten Filter (Schleicher & Schüll, Nr. 950, 7 cm) scharf abgesaugt, die Pumpe auf einen Augenblick abgestellt, und nun wäscht man mit Alkohol zweimal nach, indem man zugleich mit dem Alkohol das Bechergläschen ausspült und, falls vom Niederschlag etwas an den Wänden haftet, mit einer Gummifahne nachfährt. Hierauf saugt man wieder gut und scharf ab, nimmt mit eine Pinzette das Filter + Niederschlag ab, setzt es in ein Wägegläschen und steckt das Ganze (mit offenem Deckel) in einen Vakuum-Exsiccator. Dasselbe Becherglas wird zum Auffangen des Filtrats vom zweiten Niederschlag benutzt usw., so daß man bei der ganzen Fällung nur mit zwei Bechergläschen arbeitet. Man gibt nun nacheinander 0,7, 1, 1,5, 2 ccm usw. Silbernitrat zu[1]), so lange, bis im letzten Filtrat, das mit Alkohol und Silbernitrat stark angereichert ist, nach etwa $^1/_2$stündigem Stehen in einer Eismischung kein Niederschlag mehr entsteht. Die Silbersalze + Filter werden im Vakuum-Exsiccator über H_2SO_4 1 bis 2 Tage lang stehen gelassen. Dann schabt man möglichst quantitativ die Silbersalze in gewogene Porzellantiegel ab, wägt und stellt sie in einen Vakuum-Trockenschrank, der auf 40 bis 50° erhitzt wird[2]). Das Silbersalz ist gewöhnlich so weit getrocknet, daß es durch Umstülpen und leichtes Aufdrücken des Filterchens ganz leicht vom Papier losgelöst werden kann. Nach 3 bis 4 Stunden überzeugt man sich durch Wägung, ob Gewichtskonstanz erreicht ist, sonst läßt man nochmals 3 Stunden trocknen. Schließlich verbrennt man sowohl die Hauptmenge des Silbersalzes als auch den Silbersalzrest + Papier, und zwar jedes für sich allein.

---

[1]) Man vermeide zu viel Fraktionen, weil naturgemäß mit der größeren Zahl derselben auch mehr Fehlerquellen geschaffen werden. Am besten ist so zu arbeiten, daß man in jeder Fraktion etwa 0,1 bis 0,2 g Silbersalz zur Wägung bringt.

[2]) Die Wasserstrahlpumpe läßt man dabei die ganze Zeit laufen. Der Vakuum-Trockenschrank ist mit P_2O_5 beschickt, ebenso füllt man das zwischen der Wasserstrahlpumpe und dem Vakuumapparat eingeschaltete Gefäß (Saugflasche oder Wulffsche Flasche) mit Phosphorpentoxyd.

Das Verglühen muß sehr vorsichtig vorgenommen werden. Die Silbersalze (besonders die, die ein Gemisch verschiedener Säuren sind) verpuffen beim Verglühen, wobei sehr leicht ein kleiner Verlust an Silber entstehen kann. War die Menge des zu verglühenden Silbersalzes klein, z. B. 0,06 oder 0,08 g, so verursachen die kleinsten Verluste an Silber ziemlich erhebliche Fehler insofern, als die Silberprozentzahl heruntergedrückt wird und die Ausbeute an einzelnen Säuren ein falsches Bild liefert. Waren z. B. 0,0823 g Silbersalz zu verglühen, und war dieses Salz ein reines Essigsäuresalz, dann müßte die zurückgebliebene Silbermenge 0,0532 g betragen. Sind beim unvorsichtigen Verglühen sagen wir 0,0007 g Ag verloren gegangen, dann wird die Prozentzahl Silber nicht mehr 64,64%, sondern 63,79% sein.

Dieses Salz stellt sich also danach als ein Gemisch von Essigsäure und wenig Buttersäure dar (während es in Wirklichkeit aus reiner Essigsäure besteht), und dadurch wird nicht nur die Ausbeute an Essigsäure verringert, sondern die der Buttersäure erhöht. Um diese Fehler zu vermeiden, ist es notwendig, die Salze im Tiegel mit aschefreiem Papier zu bedecken (so daß sie ringsum von dem Papier umschlossen sind) und nun langsam bei fast geschlossenem Deckel, von oben anfangend, zu verglühen. Das Papier bildet nicht nur eine Schutzhülle beim Verspritzen, man erreicht außerdem damit, daß durch das langsame Verglimmen des Papiers das Verpuffen abgeschwächt wird. Hat man richtig verglüht, so müssen sich die Silberprozentzahlen von einer Fraktion zur anderen in aufsteigender Linie bewegen.

Die Rechnung wird folgendermaßen ausgeführt: Z. B. 0,2291 g bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Silbersalzes (Hauptmenge) lieferten beim Verglühen 0,1439 g Silber, das sind 62,81% Ag; der Silbersalzrest + Papier verbrannt ergab 0,0063 g Silber; diese Menge entspricht ($0{,}1439 : 0{,}2291 = 0{,}0063 : x$) 0,0100 g Silbersalz. Also enthielt die Fraktion zusammen: (0,2291 + 0,0100) = 0,2391 g Silbersalz. 62,81% Ag entsprechen einem Faktor für Essigsäuresalz 0,7967; werden 0,2391 g damit multipliziert, so bekommt man 0,1908 g essigsaures Ag-Salz und 0,0483 g buttersaures Ag-Salz.

Man braucht nur die entsprechenden Silbersalze zu addieren

und kann durch Multiplikation mit entsprechenden Faktoren die freien Säuren ermitteln[1]).

Wir haben festgestellt, daß mittels der Vakuum-Dampfmethode unter den oben beschriebenen Arbeitsbedingungen die Essigsäure bis zu 94%, die Capryl-, Capron- und Buttersäure fast quantitativ (98 bis 100%) zu bestimmen ist.

Wir haben ferner mit dieser Methode die flüchtigen Fettsäuren

1. in saurer Milch,
2. in Buttermilch nach Koeppe (Vilbeler Milch),
3. im normalen Bruststuhl,
4. im Enterro-Katarrhstuhl

qualitativ und in ihrer quantitativen Verteilung ermittelt.

Versuch 1.

Essigsäure.

1,3095 g $NaC_2H_3O_2 + 3H_2O$ (0,5774 g $C_2H_4O_2$) wurden in 20 ccm Wasser aufgelöst (Konzentration ca. $^1/_2$-normal) und fraktioniert gefällt. Die Niederschläge wurden auf getrockneten und gewogenen Filtern filtriert.

Fraktion	Silbersalz g	Silber g	
1	0,1109	0,0696	= 62,75% Ag
2	0,1496	0,0940	= 62,83% „
3	0,2326	0,1505	= 64,70% „
4	0,2963	0,1919	= 64,76% „
5	0,3315	0,2139	= 64,52% „
6	0,3952	0,2556	= 64,67% „

Im ganzen erhalten an Silbersalz 1,5161 g; diese entsprechen 0,5442 g freier Essigsäure. Angewandt 0,5774 g Essigsäure, d. i. eine Ausbeute von 94,28%.

In den Fraktionen 1 und 2 sind die Prozentzahlen Silber zu niedrig. Das kann entweder von Verlusten an Silber beim Verglühen herrühren oder von der Feuchtigkeit, die in beiden Fraktionen zurückgeblieben ist. Die erste Eventualität ist kaum anzunehmen, weil die Silbersalze mit

[1]) Faktor zur Berechnung:

der Essigsäure aus dem essigsauren Silber = 0,359,
„ Ameisensäure „ „ ameisensauren „ = 0,807,
„ Buttersäure „ „ buttersauren „ = 0,451,
„ Capronsäure „ „ capronsauren „ = 0,516,
„ Caprylsäure „ „ caprylsauren „ = 0,5703.

Papier verbrannt wurden, wobei eine Verpuffung so gut wie vermieden wird. Viel wahrscheinlicher ist die zweite Annahme.

Zieht man von der Fraktion 1 0,0034 g und von der Fraktion 2 0,0044 g (an Feuchtigkeit) ab, so werden in beiden Fraktionen die Prozentzahlen richtig. Die Ausbeute wird dadurch etwas kleiner; sie beträgt nunmehr 93,76%.

Versuch 2.

Mischung von buttersaurem Natrium und essigsaurem Natrium.

92,40 ccm $^n/_{10}$-NaOH { 1,2575 g $NaC_2H_3O_2 + 3H_2O$: 0,5544 g Essigsäure; 0,0602 g $NaC_4H_7O_2$: 0,0481 g Buttersäure aufgelöst in 20 ccm Wasser
5,46 „ „ {

97,86 ccm $^n/_{10}$-Lösung angewandt.

Die Silbersalze wurden auf getrockneten und gewogenen Filtern abgesaugt und nach dem Trocknen im Vakuum-Exsiccator samt Filter verbrannt.

Fraktion	Ag-Salz g	Silber g		Essigsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g
1	0,0940	0,0580	(61,70% Ag)	0,0638	0,0302
2	0,1594	0,1006	(63,10% „)	0,1316	0,0278
3	0,2721	0,1709	(62,80% „)	0,2150	0,0571
4	0,3363	0,2142	(63,69% „)	0,3000	0,0363
5	0,3665	0,2368	(64,60% „)	0,3665	—
6	0,2536	0,1588	(62,60% „)	0,1965	0,0571
7	0,1114	0,0707	(63,46% „)	0,0971	0,0143
				1,3705	0,2228

1,3705 g essigsaures Ag-Salz: 0,4920 g Essigsäure: 82,00 ccm $^n/_{10}$-Lösung
0,2228 g buttersaures „ : 0,1005 g Buttersäure: 11,42 „ „
93,42 ccm „

Das ist zwar eine Ausbeute von 95,64%, aber die vorgelegte Menge an Essigsäure ist nicht zurückgewonnen und die Buttersäuremenge viel zu hoch.

Wegen der im Papier zurückgebliebenen Feuchtigkeit und der aus diesem Grunde zu hohen Silberzahlen sind die Prozentzahlen Silber bei vielen Fraktionen heruntergedrückt und bewegen sich nicht in aufsteigender Linie. Nimmt man unter der Voraussetzung, daß die buttersauren Salze infolge ihrer schweren Löslichkeit zuerst ausfallen, an, daß die Silberprozentzahlen der ersten drei Fraktionen richtig sind, und zieht man in Fraktion 4 6 mg, in Fraktion 6 8 mg, in Fraktion 7 3 mg an Feuchtigkeit vom Silbersalz ab, so bekommen wir folgende Verteilung:

Fraktion	Ag-Salz g	Silber g		Essigsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g
1	0,0940	: 0,0580	(61,70% Ag)	0,0638	0,0302
2	0,1594	: 0,1006	(63,10% „)	0,1316	0,0278
3	0,2721	: 0,1709	(62,80% „)	0,2150	0,0571
4	0,3303	: 0,2142	(64,80% „)	0,3303	—
5	0,3665	: 0,2368	(64,60% „)	0,3665	—
6	0,2456	: 0,1588	(64,65% „)	0,2456	—
7	0,1084	: 0,0707	(64,90% „)	0,1084	—
				1,4612	0,1151

1,4612 g essigsaures Ag-Salz: 0,5245 g Essigsäure: 87,04 ccm $^n/_{10}$-Lösung
0,1151 g buttersaures „ : 0,0519 g Buttersäure: 5,90 „ „
92,94 ccm „

Das ist eine Ausbeute von rund 95%.

Wir sehen, daß, wenn man eine kleine Korrektur anbringt, die die Feuchtigkeit berücksichtigt und die wir hier zwar nur ausgerechnet, später aber tatsächlich bestimmt haben, das quantitative Bild ein richtiges wird. Die Mengen an Essigsäure und Buttersäure stimmen mit den vorgelegten fast überein, und zwar derart, daß die Buttersäure quantitativ zurückerhalten wird, bei der Essigsäure dagegen ca. 5,4% Verluste vorkommen. Von der Essigsäure allein wird hier also der Anteil bestritten, der zu 100% an der Ausbeute fehlt.

Versuch 3.

Mischung von Essigsäure und Buttersäure.

11,08 ccm $^n/_{10}$-Lösung } 0,0975 g Buttersäure } wurden in 350 ccm Wasser gelöst
32,53 „ „ } 0,1952 g Essigsäure } u. im Vakuumdampf destilliert.
43,61 ccm „ angewandt.

1. Destillat (1060 ccm), davon 100 ccm titriert: 3,66 ccm $^n/_{10}$-NaOH
2. „ (1320 „), „ 100 „ „ : 0,37 „ „
4,03 „ „

Auf das ganze Destillat umgerechnet 1: 38,80 ccm $^n/_{10}$-Lösung
2: 4,90 „ „
43,70 „ „
— 4,03 „ „
39,67 „ „

Das gesamte Destillat wurde mit 39 ccm $^n/_{10}$-NaOH neutralisiert, auf etwa 100 ccm eingeengt, durch ein kleines Filter filtriert, mit warmem Wasser nachgewaschen, im Bechergläschen weiter auf 25 ccm eingedampft und fraktioniert mit Silbernitrat gefällt. Die Silbersalze wurden auf nicht gewogenen und nicht getrockneten Filtern abgesaugt, mit absolutem Alkohol nachgewaschen, im Vakuum-Exsiccator über H_2SO_4 2 Tage lang getrocknet, dann die Hauptmenge des Salzes in gewogene Porzellantiegel abgeschabt, im Vakuum-Trockenschrank bei 40 bis 50° über P_2O_5 zur

Gewichtskonstanz getrocknet, mit aschefreiem Papier bedeckt und vorsichtig bei fast geschlossenem Deckel verglüht. Der Silbersalzrest + Papier wurde für sich in einem Porzellantiegel verbrannt.

Fraktion	Ag - Salz g		Silber g		Essigsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g
1	0,0756	:	0,0440	(58,2% Ag)	—	—
	0,0110	←	0,0064		—	—
	0,0866				0,0260	0,0606
2	0,1996	:	0,1226	(61,42% „)	—	—
	0,0237	←	0,0146		—	—
	0,2233				0,1445	0,0788
3	0,2291	:	0,1439	(62,81% „)	—	—
	0,0100	←	0,0063		—	—
	0,2391				0,1908	0,0483
4	0,0993	:	0,0630	(63,44% „)	—	—
	0,0228	←	0,0145		—	—
	0,1221				0,1062	0,0159
					0,4675	0,2036

0,4675 g essigsaures Ag-Salz: 0,1678 g Essigsäure,
0,2036 g buttersaures Ag-Salz: 0,0918 g Buttersäure.

In den zur Titration verwendeten 4,03 ccm sind enthalten:
an Essigsäure (39,67 : 0,1678 = 4,03 : x) 0,0170 g
an Buttersäure . . . . . 0,0090 g.

Also: 0,1678 g
0,0170 g
0,1848 g Essigsäure (angewandt 0,1952 g), d. s. 94%,
0,0918 g
0,0090 g
0,1008 g Buttersäure (angewandt 0,0975 g), d. s. 103%.

Gesamtausbeute: angewandt . . . 43,6 ccm $^n/_{10}$-Lösung,
zurückgewonnen 42,2 „ „ , d. s. 97%.

Die Buttersäure-Ausbeute ist, wie man sieht, um ein Geringes zu hoch, was nur an einem kleinen Verlust von Silber beim Verglühen liegen kann, wodurch sich die Ausbeute an Buttersäure auf Kosten der Essigsäure erhöht.

Versuch 4.

Mischung von Capryl-, Capron-, Butter- und Essigsäure.

10,58 ccm $^n/_{10}$-Lösung	0,1527 g Caprylsäure	}	wurden in 450 ccm Wasser aufgelöst u. im Vakuumdampf destilliert
8,34 „ „	0,0969 g Capronsäure		
11,94 „ „	0,1051 g Buttersäure		
32,58 „ „	0,1955 g Essigsäure		
9,45 „ „	0,1 ccm Milchsäure ($D = 1,21$)		
72,89 „ „			

Wir haben zu der Mischung eine 9,45 ccm $^n/_{10}$-Lösung entsprechende Menge an Milchsäure zugegeben, um nochmals einwandfrei zu zeigen, daß die Milchsäure im Vakuumdampf nicht flüchtig ist (dagegen sehr wohl im Dampfstrom allein) und auf diese Weise von den flüchtigen Fettsäuren quantitativ getrennt werden kann. Zieht man von den

72,89 ccm $^n/_{10}$-Lösung die der Milchsäure entsprechenden
9,45 „ „ „ ab, so bleiben als angewandt
63,44 „ „ .

1. Destillat (1470 ccm) davon 100 ccm titriert 4,05 $^n/_{10}$-NaOH
2. „ ($2^1/_2$ Std. destilliert) (1840 ccm) davon 100 ccm titriert 0,25 „
4,30 „

Auf das ganze Destillat umgerechnet 1: 59,53
2: 4,6
64,13 ccm $^n/_{10}$-Lösung.

Wir sehen, daß bis auf eine minimale Differenz die ganze Milchsäure im Rückstand zurückgeblieben ist.

Es müßten noch im Rückstand sein: 72,89
— 64,13
8,96 ccm $^n/_{10}$-Lösung.

Wir haben den Rückstand mit einer $^n/_{10}$-NaOH titriert und fanden tatsächlich 8,45 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure.

Besonders für die Bestimmung der Milchsäure in der Milch, im Mageninhalt usw. ist dies von Wichtigkeit. Will man nämlich die Milchsäure nach der Methode von Boas[1]) bzw. von Fürth und Charnaß[2]) bestimmen, so muß man sie vorher aus der Milch extrahieren. Das ist mit ziemlich großen Schwierigkeiten verbunden und hier wäre ein Weg gegeben, auf die Extraktion verzichten zu können. Unterwirft man nämlich, nachdem man die Vakuum-Dampfdestillation ausgeführt hat, den Rückstand einer erneuten Destillation im Dampfstrom, so geht dabei, wie das schon Welde[3]) gezeigt hat, die Milchsäure fast quantitativ über. Man braucht nur das Destillat genau zu neutralisieren, auf ein kleines Volumen einzudampfen und kann dann weiter nach der Fürthschen Methode die Milchsäure in Aldehyd zersetzen, diesen in einer Natriumbisulfitlösung auffangen und den Überschuß an $Na_2S_2O_3$ mit Jod titrieren. Bestimmtes können wir darüber noch nicht aussagen, da wir erst mit diesbezüglichen Vorversuchen beschäftigt sind. Um nun auf den Versuch zurückzukommen:

Das Gesamtdestillat: 64,13
— 4,30
59,83

wurde mit 59 ccm $^n/_{10}$-NaOH neutralisiert und das fraktionierte Fällen

[1]) Boas, Deutsche med. Wochenschr. 18, 940, 1893.
[2]) Fürth und Charnaß, diese Zeitschr. 26, 199, 1910.
[3]) Welde, diese Zeitschr. 28, 513, 1910.

und Trocknen genau so wie in Versuch 3 ausgeführt, mit dem kleinen Unterschied, daß die ersten drei Fraktionen nicht mit absolutem, sondern mit 93%igem Alkohol gewaschen wurden.

Fraktion	Ag - Salz g		Silber g		Caprylsaures Ag-Salz g	Capronsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g	Essigsaures Ag-Salz g
1	0,1426	:	0,0610	(42,8% Ag)	—	—	—	—
	0,0130	←	0,0056		—	—	—	—
	0,1556				0,1556	—	—	—
2	0,1180	:	0,0524	(44,4% „)	—	—	—	—
	0,0100	←	0,0044		—	—	—	—
	0,1280				0,0949	0,0331	—	—
3	0,1418	:	0,0696	(49,08% „)	—	—	—	—
	0,0134	←	0,0066		—	—	—	—
	0,1552				—	0,1402	0,0150	—
4	0,1070	:	0,0613	(57,29% „)	—	—	—	—
	0,0151	←	0,0087		—	—	—	—
	0,1221				—	—	0,0973	0,0248
5	0,1419	:	0,0865	(60,95% „)	—	—	—	—
	0,0077	←	0,0047		—	—	—	—
	0,1496				—	—	0,0604	0,0892
6	0,1701	:	0,1078	(63,37% „)	—	—	—	—
	0,0107	←	0,0067		—	—	—	—
	0,1808				—	—	0,0250	0,1550
7	0,2260	:	0,1439	(63,7% „)	—	—	—	—
	0,0020	←	0,0012		—	—	—	—
	0,2280				—	—	0,0247	0,2033
					0,2505	0,1733	0,2224	0,4723

0,2505 g caprylsaures Ag-Salz: 0,1428 g Caprylsäure,
0,1733 g capronsaures Ag-Salz: 0,0894 g Capronsäure,
0,2224 g buttersaures Ag-Salz: 0,1003 g Buttersäure,
0,4723 g essigsaures Ag-Salz: 0,1695 g Essigsäure.

In den zur Titration gebrauchten 4,3 ccm sind enthalten:
an Caprylsäure 0,0103 g,
an Capronsäure 0,0061 g,
an Buttersäure 0,0072 g,
an Essigsäure 0,0122 g.

Also: 0,1428 g
0,0103 g
0,1531 g Caprylsäure (angewandt 0,1527 g), d. s. 100,2%,
0,0894 g
0,0061 g
0,0955 g Capronsäure (angewandt 0,0969 g), d. s. 98,5%),

0,1003 g
0,1075 g
0,1072 g Buttersäure (angewandt 0,1051 g), d. s. 102%
0,1695 g
0,0122 g
0,1817 g Essigsäure (angewandt 0,1955 g), d. s. 93%.

Gesamtausbeute: angewandt 63,44 ccm $^n/_{10}$-Lösung,
zurückgewonnen 61,4 „ „ , d. s. 96%.

Saure Milch

erzeugt durch Stehen einer Milch im Brutschrank bei 37° durch 48 Std.

1 l dieser Milch im Vakuumdampf destilliert.

Gesamtdestillat 45 ccm $^n/_{10}$-Lösung.

Zur Titration des aliquoten Teils gebraucht: 3 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

Fraktion	Silbersalz g	Silber g		Essigsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g
1	0,1383	0,0813	(58,78% Ag)	0,0502	0,0881
2	0,0737	0,0436	(59,10% „)	0,0293	0,0447
3	0,1699	0,1088	(64,03% „)	0,1571	0,0128
4	0,1134	0,0733	(64,6 % „)	0,1134	—
5	0,1180	0,0762	(64,58% „)	0,1180	—
				0,4680	0,1456

0,4680 g essigsaures Ag-Salz: 0,1680 g Essigsäure,
0,1456 g buttersaures Ag-Salz: 0,0656 g Buttersäure.

In den zur Titration gebrauchten 3 ccm sind enthalten:

0,0120 g Essigsäure,
0,0046 g Buttersäure,

also: 0,1800 g Essigsäure : 30 ccm $^n/_{10}$-Lösung,
0,0701 g Buttersäure: 8 „ „
zurückgewonnen: 38 „ „
angewandt: 45 „ „

d. s. 84,4% Gesamtausbeute.

Berechnet man die zu 100% fehlenden 15% als Essigsäure, so sind in 100 ccm dieser sauren Milch: 0,02 g Essigsäure,
0,007 g Buttersäure.

Buttermilch (holländische Säuglingsnahrung) nach Prof. Koeppe (Vilbeler Milch).

I. a) 250 ccm Milch im Vakuumdampf destilliert.

1. Destillat (1 Std.) (1200 ccm) 100 ccm: 1,65 ccm NaOH
2. „ (1240 „) 100 „ : 0,40 „ „
2,05 „ „

Im Gesamtdestillat: 19,80
4,96
24,76
— 2,05
22,71

b) 245 ccm Milch im Vakuumdampf destilliert.
1. Destillat (1400 ccm) 100 ccm: 1,40 ccm NaOH
2. „ (1100 „) 100 „ : 0,35 „ „
1,75 „ „

Im Gesamtdestillat: 19,6
3,85
23,45
— 1,75
21,70

Im ganzen: 24,76
23,45
48,21 ccm $^n/_{10}$-Lösung.

22,71
21,70
44,11 ccm $^n/_{10}$-Lösung zur Untersuchung angewandt, mit 43 ccm $^n/_{10}$-NaOH neutralisiert, eingedampft usw.

Fraktion	Silbersalz g	Silber g		Essigsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g
1	0,0714	0,0470	(60,57% Ag)	0,0397	0,0317
2	0,1601	0,1021	(63,75% „)	0,1437	0,0164
3	0,2096	0,1347	(64,26% „)	0,1996	0,0100
4	0,1881	0,1228	(65,25% „)	0,1706	—
5	0,0841	0,0545	(64,75% „)	0,0835	—
				0,6371	0,0581

außerdem noch an ameisensaurem Ag-Salz: 0,0181 g.

0,6371 g essigsaures Ag-Salz: 0,2287 g Essigsäure,
0,0581 g buttersaures Ag-Salz: 0,0262 g Buttersäure,
0,0181 g ameisensaures Ag-Salz: 0,0055 g Ameisensäure.

In den zur Titration des aliquoten Teiles angewandten 3,8 ccm sind enthalten an:

Essigsäure : 0,0190 g,
Buttersäure : 0,0021 g,
Ameisensäure : 0,0004 g.

Also Essigsäure : 0,2477 g : 41,21 ccm $^n/_{10}$-Lösung,
Buttersäure : 0,0283 g : 3,21 „ „
Ameisensäure : 0,0059 g : 1,28 „ „
zurückgewonnen: 45,70 „ „
angewandt : 48,21 „ „

d. s. 94,8% Gesamtausbeute.

Zur Untersuchung gebraucht: 495 ccm Vilbeler Milch, also in 100 ccm Vilbeler Milch: 0,0510 g Essigsäure,

0,0057 g Buttersäure,

und Spuren von Ameisensäure.

II. 920 ccm Vilbeler Milch im Vakuumdampf destilliert (in 4 Portionen à 250 ccm).

Gesamtdestillat 64,6 ccm $^n/_{10}$-Lösung.

5,6 ccm zur Titration des aliquoten Teils angewandt.

Fraktion	Silbersalz g	Silber g		Essigsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g
1	0,0836	0,0492	(58,80% Ag)	0,0310	0,0526
2	0,1851	0,1136	(61,30% „)	0,1170	0,0674
3	0,2310	0,1450	(62,79% „)	0,1762	0,0548
4	0,0800	0,0511	(63,80% „)	0,0718	0,0082
5	0,0928	0,0592	(63,79% „)	0,0833	0,0095
6	0,2290	0,1487	(64,90% „)	0,2290	—
7	0,1491	0,0937	(64,80% „)	0,1491	—
				0,8574	0,1925

0,8574 g essigsaures Ag-Salz: 0,3078 g Essigsäure,
0,1925 g buttersaures Ag-Salz: 0,0868 g Buttersäure.

In den zur Titration verbrauchten 5,6 ccm sind enthalten:

0,0292 g Essigsäure,
0,0008 g Buttersäure.

Also:

0,3370 g Essigsäure : 50,61 ccm $^n/_{10}$-Lösung,
0,0948 g Buttersäure : 11,80 „ „
zurückgewonnen: 62,41 „ „
angewandt : 64,60 „ „

d. s. 96,6% Gesamtausbeute.

In 920 ccm Vilbeler Milch: 0,3370 g Essigsäure,
0,0948 g Buttersäure,

also sind in 100 ccm Vilbeler Milch enthalten:

0,0366 g Essigsäure,
0,01 g Buttersäure.

Wie wir uns durch zahlreiche Untersuchungen überzeugt haben, wechselt der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren in der Vilbeler Milch, doch bleibt er in einer Lieferungsserie ziemlich gleich. Gebundene flüchtige Fettsäuren sind in der Vilbeler Milch in sehr geringer Menge vorhanden. Auf die Bestimmung der letzteren haben wir verzichtet, haben also ohne Zugabe von Phosphorsäure destilliert.

„Normaler" Bruststuhl.

(März 1912, Kind B.) 44,4 g Stuhl (hellgelb, stark sauer) wurden in Wasser suspendiert und unter Zugabe von 7,5 ccm Phosphorsäure ($D = 1{,}12$) im Vakuumdampf destilliert. Destillate frei von Cl und Phosphorsäure.

1. Destillat (900 ccm) 100 ccm: 4,6 ccm $^n/_{10}$-NaOH
   41,5 ccm $^n/_{10}$-Lös.
2. „ (900 „) 100 „ : 1,4 „ „
   12,85 „ „
3. „ (1060 „) 100 „ : 0,25 „ „
   2,78 „ „
   57,13 „ „
   — 6,25 „ „
   50,88 „ „

Das Gesamtdestillat wurde mit 49 ccm $^n/_{10}$-NaOH neutralisiert.

Fraktion	Silbersalz g	Silber g		Ameisensaures Ag-Salz g	Essigsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g
1	0,0848	0,0541	(64,80% Ag)	—	0,0958	0,0090
2	0,0827	0,0531	(64,17% „)	—	0,0782	0,0045
3	0,1974	0,1270	(64,32% „)	—	0,1889	0,0085
4	0,1676	0,1081	(64,53% „)	—	0,1676	0,0028
5	0,1377	0,0888	(64,44% „)	—	0,1349	—
6	0,0894	0,0590	(66,00% „)	0,0207	0,0687	—
				0,0207	0,7141	0,0248

0,7141 g essigsaures Ag-Salz: 0,2564 g Essigsäure,
0,0248 g buttersaures Ag-Salz: 0,0112 g Buttersäure,
0,0207 g ameisensaures Ag-Salz: 0,0063 g Ameisensäure.

In den zur Titration verbrauchten 6,25 ccm sind enthalten:

0,0315 g Essigsäure,
0,0014 g Buttersäure,
0,0007 g Ameisensäure.

Also: 0,2879 g Essigsäure : 48,00 ccm $^n/_{10}$-Lösung,
0,0126 g Buttersäure : 1,43 „ „
0,0070 g Ameisensäure : 1,50 „ „
zurückgewonnen: 50,93 „ „
angewandt : 57,13 „ „

d. s. 90% Gesamtausbeute.

Berechnet man die 10% Verluste auf Essigsäure, so bekommen wir in 100 g (feuchter Stuhl):

0,7 g Essigsäure,
0,125 g Buttersäure
und Spuren Ameisensäure.

„Entero-Katarrh"-Stuhl (bei einem mit Frauenmilch ernährten Kinde).

Stuhl flüssig, gelb-grün, stark sauer; unter Zusatz von 7,5 ccm Phosphorsäure destilliert.

a) 29 g Stuhl.

1. Destillat (1180 ccm) 50 ccm: 0,4 $^n/_{10}$-NaOH: 9,4 $^n/_{10}$-Lösung.
2. „ (620 „) 50 „ : 0,15 „ : 1,8 „
11,2 „

b) 47 g Stuhl.

1. Destillat (1220 ccm) 50 ccm: 0,6 $^n/_{10}$-NaOH: 14,6 $^n/_{10}$-Lösung.
2. „ (680 „) 50 „ : 0,25 „ : 3,2 „
17,8 „

c) 17,9 g Stuhl.

1. Destillat (1220 ccm) 50 ccm: 0,3 $^n/_{10}$-NaOH: 7,2 $^n/_{10}$-Lösung.

Gesamtdestillat: 36,2 ccm $^n/_{10}$-Lösung,
Zur Titration : 1,7 „ „
34,5 „ „
neutralisiert mit 34 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

Fraktion	Silbersalz g	Silber g		Essigsaures Ag-Salz g	Buttersaures Ag-Salz g
1	0,0971	0,0551	(56,64% Ag)	0,0135	0,0836
2	0,2119	0,1284	(60,50% „)	0,1165	0,0954
3	0,1775	0,1122	(63,20% „)	0,1491	0,0284
4	0,0720	0,0460	(63,88% „)	0,0656	0,0064
				0,3447	0,2138

0,3447 g essigsaures Ag-Salz: 0,1237 g Essigsäure,
0,2138 g buttersaures Ag-Salz: 0,0964 g Buttersäure.

In den zur Titration verbrauchten 1,7 ccm sind enthalten:

0,0061 g Essigsäure,
0,0047 g Buttersäure.

Also:

0,1298 g Essigsäure : 21,6 ccm $^n/_{10}$-Lösung,
0,1011 g Buttersäure : 11,4 „ „
zurückgewonnen: 33,0 „ „
angewandt : 36,2 „ „

d. s. 91% Gesamtausbeute.

Dieser Stuhl enthält also zu gleichen Teilen Essigsäure und Buttersäure.

Zusammenfassung.

1. Mittels der Vakuum-Dampfdestillation und einer nachträglichen fraktionierten Fällung mit $AgNO_3$ lassen sich die

flüchtigen Fettsäuren quantitativ bestimmen, und zwar (nach der von uns angegebenen Arbeitsweise) die Essigsäure bis 94%, Capryl-, Capron- und Buttersäure bis 98 und 100%.

2. Außer auf Milch, Stuhl, Magen- und Darminhalt läßt sich die Methode auf die Untersuchung anderer tierischer und pflanzlicher Materialien übertragen. Selbstverständlich dürfen bei der Destillation nicht andere, flüchtige Bestandteile übergehen, die mit $AgNO_3$ Salze geben.

3. Diese Methode hat sich bei der Bestimmung des Gehaltes an flüchtigen Fettsäuren an verschiedenem Material gut bewährt, z. B. bei der Untersuchung von Milch (saure Milch, Vilbeler Buttermilch) und Stühlen (normale und pathologische).

Erklärung der Versuchsergebnisse von Chauveau über die Minderwertigkeit der Fette Kohlenhydraten gegenüber als Energiespender bei Muskelarbeit.

Von

L. S. Fridericia.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität zu Kopenhagen.)

(Eingegangen am 22. Mai 1912.)

Durch Untersuchungen von N. Zuntz und seinen Mitarbeitern[1]) und besonders durch die vorzüglichen Versuche von W. O. Atwater, F. G. Benedict und R. D. Milner[2]) ist es erwiesen, daß die Energieverwertung der verschiedenen Hauptnährstoffe, Eiweiß, Fett und Kohlenhydrate bei Muskelarbeit dieselbe ist, d. h. daß eine Person, die täglich eine Muskelarbeit einer gegebenen Größe ausführt, unter übrigens gleichartigen Verhältnissen dieselbe Energieproduktion hat, gleichgültig wie auch ihre Nahrung zusammengesetzt sei.

Indessen haben Chauveau und seine Mitarbeiter als bekannt behauptet, daß Kohlenhydrate als Energiespender bei Muskelarbeit ökonomischer als Fette sind, d. h. daß dieselbe Muskelarbeit die Energieproduktion eines Tieres weit stärker erhöhen wird, wenn dieses allein durch Fett und Eiweiß ernährt wird, als wenn es durch die isodyname Menge Kohlen-

[1]) N. Zuntz und J. Loeb, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. **1904**, 541. — H. Newton Heinemann, Arch. f. d. ges. Physiol. **83**, 441, 1901. — F. Frentzel und F. Reach, Arch. f. d. ges. Physiol. **83**, 447, 1901.

[2]) W. O. Atwater and F. G. Benedict, U. S. Dep. of Agriculture. Off. of experiment Stations. Bull. **136**, 1903. — F. G. Benedict and R. D. Milner, ib. Bull. **175**, 1907.

hydrate und Eiweiß ernährt wird. Die Ursache hiervon sollte nach der Anschauung Chauveaus sein, daß die Energie der Muskelarbeit immer durch Zersetzung von Kohlenhydraten geleistet wird und daß daher Fette erst in Kohlenhydrate umgebildet werden müssen, ehe sie das Material, das die Muskeln erfordern, bilden können. Aber durch diese Umbildung mußte ein Teil des Energieinhaltes der Fette (ca. 30 %) als Wärme verloren gehen.

Chauveau basiert diese Anschauungen teils auf theoretische Erwägungen, teils auf Versuche[1]), und seine Versuchsergebnisse sind gegenseitig gut übereinstimmend. Die Versuchsergebnisse von Chauveau widersprachen anscheinend den Ergebnissen von Zuntz, Atwater und Benedict, und soweit ich weiß, hat man sie bis jetzt unerklärt gelassen, indem man sich damit tröstete, daß die Technik von Chauveau nicht dazu geeignet war, die untersuchten Probleme zu beantworten. Ich möchte im folgenden darauf aufmerksam machen, daß die Versuche von Atwater, Benedict und Milner nicht nur zeigen, daß Fette und Kohlenhydrate als Energiespender bei Muskelarbeit gleichwertig sind, sondern auch erklären, wie die Ergebnisse von Chauveau zustande kommen mußten.

Das Verfahren bei den verschiedenen Versuchen von Chauveau war in der Hauptsache dasselbe, und ein einziges Beispiel (von Compt. rend. 125, 1070, 1897 genommen) wird seine Versuchsmethode erklären. Er hielt lange Zeit hindurch einen Hund unter denselben äußeren Bedingungen und ließ ihn jeden Tag eine Muskelarbeit von derselben Größe ausführen. Sie wurde dadurch ausgeführt, daß der Hund in einer Tretbahn lief, welche mit konstanter Schnelligkeit von einer Maschine gedreht wurde. Jeden Tag lief der Hund auf diese Weise eine gleich weite Strecke. Während die Größe der Muskelarbeit und die äußeren Verhältnisse von Tag zu Tag gleich gehalten wurden, wurde die Nahrung des Hundes variiert. Während der ersten 6 Tage des Versuches bekam er 400 g Fleisch und 51 g Schweinefett pro die, während der nächsten 6 Tage 400 g Fleisch und 121 g Rohrzucker, dann wieder Fleisch und Fett und so fort abwechselnd. Weil 51 g Schweine-

[1]) Compt. rend. de l'Acad. 125, 1070, 1897; 126, 795 und 1072, 1898 u. a. St.

fett mit 121 g Rohrzucker isodynam ist, bekam der Hund also während des ganzen Versuches Nahrung mit demselben täglichen physiologischen Nutzwert. Aber nun ergab es sich, daß in allen den Perioden, wo man ihn mit Fleisch und Fett fütterte, sich sein Körpergewicht konstant hielt oder ein wenig abnahm, während das Körpergewicht in den Fleisch- und Zuckerfütterungsperioden zunahm. Chauveau schloß daraus, daß die 51 g Fett nicht dieselbe Fähigkeit zur Erhaltung des Ernährungszustandes als die isodyname Menge Zucker gehabt hatte. Die Energieproduktion des Hundes, meinte er, mußte in den Fettperioden größer als in den Zuckerperioden gewesen sein. Isodyname Mengen von Fett und Zucker mußten natürlicherweise gleich große Energiemengen frei machen durch ihre Zersetzung im Stoffwechsel des Hundes, aber die totale Energieproduktion war größer gewesen, wenn der Hund auf Fettnahrung, als wenn er auf Kohlenhydratnahrung gesetzt war, und in beiden Fällen dieselbe Muskelarbeit ausführte. Die Muskelarbeit sollte also ökonomischer mit Kohlenhydratnahrung als mit Fettnahrung ausgeführt werden.

Chauveau wiederholte auf mehrere Weisen seinen Versuch und bekam immer dasselbe Ergebnis: eine gewisse Menge Kohlenhydrat erhielt das Körpergewicht besser als die isodyname Menge Fett.

Chauveau zog seine Folgerungen aus den Änderungen des Körpergewichtes des Hundes. Aber Änderungen des Körpergewichtes können ja nicht allein durch eine Änderung des Vorrats an organischen Stoffen des Körpers entstehen, sondern auch durch eine Änderung des Wassergehaltes des Körpers, und hier liegt gerade die Erklärung der Ergebnisse Chauveaus. Dieses ergibt sich deutlich durch einen Vergleich der Versuche Chauveaus mit den Experimenten von Benedict und Milner. Besonders bezeichnend ist das Ergebnis der Experimente Nr. 62 und 63 im Bulletin Nr. 175.

Diese zwei Experimente wurden in unmittelbarem Anschluß aneinander an einem erwachsenen Mann ausgeführt und jedes derselben dauerte 3 Tage. Die Versuchsperson hielt sich also im ganzen 6 Tage im Respirationskalorimeter von Benedict auf. Er brachte jeden Tag eine bedeutende Muskelarbeit zur Ausführung dadurch, daß er ein als Ergometer eingerichtetes

Rad trat. Während der ersten 3 Tage (Experiment Nr. 62) genoß er eine kohlenhydratreiche Nahrung, während der letzten 3 Tage (Experiment Nr. 63) eine fettreiche. Der physiologische Nutzwert der täglichen Nahrung und die tägliche Muskelarbeit waren sehr annähernd gleich. In den Versuchen wurden auch die täglichen Änderungen des Körpergewichtes der Versuchsperson sowie auch der Wassergehalt seines Körpers bestimmt. Das Ergebnis war das folgende:

Pro 24 Stunden	Versuch 62 66 % der Energie der Nahrung in Kohlenhydraten	Versuch 63 67 % der Energie der Nahrung in Fett
Physiologischer Nutzwert der Nahrung	4276 Cal.	4407 Cal.
Muskelarbeit	459 „	459 „
Energieproduktion	4821 „	4890 „
Verlorene Körpersubstanz mit einem Energiewert von . .	− 476 „	− 524 „
Änderung des Wassergehaltes des Körpers	+ 165,4 g	− 906,3 g
Änderung d. Körpergewichtes	+ 61,3 g	− 913,8 g

Aus der Tabelle ergibt es sich, daß die Versuchsperson von Benedict ganz dieselben Verhältnisse als der Hund von Chauveau dargeboten hat. Obgleich die Energieproduktion der Versuchsperson pro 24 Stunden beinahe genau dieselbe während der Kohlenhydratperiode als während der Fettperiode gewesen ist, so hat er doch täglich an Körpergewicht zugenommen, während er kohlenhydratreiche Nahrung bekam, aber abgenommen, während er fettreiche bekam. Die Änderungen sind nicht klein. Während der 3 Tage des einen Versuches nahm er im ganzen 0,2 kg an Gewicht zu, während des zweiten nahm er 2,7 kg ab. Aber beinahe die ganze Gewichtsänderung verdankt man der Änderung des Wassergehaltes des Körpers. Der Körper wird wasserreicher, wenn die Nahrung größtenteils aus Kohlenhydraten besteht, wasserärmer, wenn dieselbe aus Fett besteht. Obgleich Kohlenhydrate und Fette, wie es sich aus dem Versuche ergibt, gleich ökonomisch als Energiespender gewesen sind, ist es doch richtig, daß eine gewisse Menge Kohlenhydrate das Körpergewicht besser als die isodyname Menge Fett erhält.

Auch die älteren Versuche von Atwater und Benedict zeigen, daß der Organismus geneigt ist, seinen Wassergehalt zu vermehren, wenn derselbe mit kohlenhydratreicher Nahrung ernährt wird. Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht der amerikanischen Versuche von Bull. 136 (ib.), alle an derselben Person ausgeführt.

Versuche mit kohlenhydratreicher Nahrung.

Pro 24 Stunden	Physiol. Nutzw. d. Nahrung	Wärmeabgabe	Muskelarbeit	Veränderung d. Wassergehaltes d. Körpers
Versuch Nr. 40	4180 Cal.	5223 Cal.	518 Cal.	+ 23,9 g
„ „ 44	4602 „	5198 „	571 „	+ 111,2 g
„ „ 47	4366 „	5248 „	562 „	− 35,8 g
„ „ 53	5132 „	5178 „	587 „	+ 296,1 g
Durchschnitt	4570 Cal.	5212 Cal.	559 Cal.	+ 98,8 g
Versuche mit fettreicher Nahrung.				
Versuch Nr. 41	4150 Cal.	5242 Cal.	522 Cal.	− 50,2 g
„ „ 43	4496 „	5205 „	548 „	+ 35,8 g
„ „ 46	4478 „	5238 „	551 „	− 0,7 g
„ „ 52	5120 „	5277 „	607 „	+ 3,0 g
Durchschnitt	4561 Cal.	5280 Cal.	557 Cal.	− 3,0 g

Außer den amerikanischen Versuchen gibt es auch in der Literatur andere Untersuchungen, die mehr oder weniger klar zeigen, daß der Säugetierorganismus durch eine kohlenhydratreiche Nahrung wasserreicher wird, als durch eine fett- und eiweißreiche. Ich werde 2 Beispiele anführen.

Bischoff und Voit[1]) ernährten einen Hund während 41 Tagen mit Brot; während dieses Zeitraumes verlor der Hund 126 g N von seinem Körper, 3717 g Fleisch entsprechend. Weil er nur 531 g an Körpergewicht verlor, meinen die zwei Verfasser, daß das Tier wasserreicher geworden sein muß. Da der Hund danach mit 1800 g Fleisch des Tages gefüttert wurde, „ließ er das Wasser sozusagen in Strömen fahren".

Überzeugender sind einige neuere Versuche von Richard Weigert[2]). Er ernährte Hunde von demselben Wurf bezüglich mit Rahm, Zentrifugenmilch, Buttermilch und Brot + Zucker

[1]) Die Gesetze der Ernährung des Fleischfressers, 1860, S. 210.
[2]) Jahrb. f. Kinderheilk. **61**, 178, 1905.

und analysierte ihre Körpersubstanz mit dem folgenden Ergebnis:

Ernährung		Trocken-substanz %	Fett %	Trocken-subst. in fett-freier Subst. %
Wurf 1	Rahm	41,1	10,0	34,6
	Zentrifugenmilch . .	29,6	2,4	28,5
	Brot + Zucker . . .	28,0	4,4	24,7
Wurf 2	Rahm	39,3	18,6	25,4
	Buttermilch	24,6	3,7	21,7
Wurf 3	Rahm	36,5	14,5	25,7
	Buttermilch	29,5	12,3	19,5

In diesen Versuchen ist die fettfreie Körpersubstanz der Tiere in allen Fällen wasserärmer nach fettreicher Nahrung als nach mehr kohlenhydratreicher.

Obige Darlegungen erklären, wie mir scheint, vollauf die Versuchsergebnisse von Chauveau in seinen sogenannten klassischen Versuchen, die immer in der französischen physiologischen Literatur eine große Rolle spielen. (Siehe z. B. im großen Sammelwerk von Jules Lefèvre, „Chaleur animale et Bioénergétique", Paris 1911, S. 885.) Die Beobachtung Chauveaus war richtig: es ist korrekt, daß Kohlenhydrate einem größeren Verlust des Körpergewichts vorbeugen, als die isodyname Menge Fett; aber der Unterschied beruht auf der Änderung des Wassergehaltes des Körpers. Chauveaus Deutung seiner Versuchsergebnisse war dagegen fehlerhaft. Es ist sicher, daß Kohlenhydrate und Fette gleich ökonomisch als Energiespender bei Muskelarbeit sind.

Studien über das Fibrinogen.

I. Mitteilung.

Über die biologische Differenzierung der drei Eiweißkörper des Blutplasmas.

Von

J. Bauer und St. Engel.

(Aus der Düsseldorfer Kinderklinik.)

(Eingegangen am 23. Mai 1912.)

In einer früheren Arbeit[1]) hatten wir gezeigt, daß die drei Eiweißkörper der Milch sich chemisch und biologisch voneinander trennen lassen. Albumin und Globulin der Milch erwiesen sich als nahe Verwandte, während das Casein sich von ihnen weit entfernte. Diese Differenz ist so groß, daß sie dem Casein unter den bekannten Eiweißkörpern eine Sonderstellung zuweist. Das Casein einer Art steht nämlich dem Casein einer eng verwandten Art näher als den Molkenproteinen der eigenen[2]).

Die drei Eiweißkörper des Plasmas verhalten sich biochemisch ganz ähnlich wie die der Milch. Einer von ihnen, das Fibrinogen, ist koagulierbar. Gerinnt er, so verbleiben in der restierenden Flüssigkeit das Serumalbumin und -globulin, die, wie wir in jener erwähnten Arbeit nachweisen konnten, mit dem Lactalbumin und -globulin identisch sind.

Unsere diesmalige Aufgabe war es, die Stellung des Fibrinogens zu den Serumeiweißkörpern zu studieren.

---

[1]) Bauer und Engel, Über die chemische und biologische Differenzierung der drei Eiweißkörper in der Kuh- und Frauenmilch. Diese Zeitschr. **31**, 46.

[2]) Kollmeyer, Über die biologische Differenzierung von Milch und Milcheiweißkörpern. Zeitschr. f. Biol. **54**, 64.

Wir stellten zunächst Rinderfibrinogen nach der durch Heubner modifizierten Methode Hamarstens dar. Das Oxalatplasma wurde mit kalkfreiem Kcchsalz total gesättigt, der entstehende Niederschlag abcentrifugiert und wieder gelöst. Hierauf wurde unter Kontrolle des Aërometers konzentrierte Kochsalzlösung bis zur knappen Halbsättigung zugegeben. Sofort entstanden große Flocken, die sich zu zähen Gerinnseln zusammenballten. Nachdem sie zwischen Fließpapier sorgfältig abgepreßt waren, wurden sie in 5%iger NaCl-Lösung wieder aufgelöst. Um das Gallertigwerden zu verhüten, erhielt die Flüssigkeit einen Zusatz von 0,1% Kaliumoxalat.

Auf analoge Weise wurde auch ein Schweinefibrinogen hergestellt.

Mit den so gewonnenen Fibrinogenlösungen, sowie mit Serum und Plasma wurden mit Hilfe der Komplementablenkungsmethode die nötigen Auswertungen vorgenommen.

Das Resultat war eindeutig. Das Fibrinogenantiserum reagierte ausschließlich mit Fibrinogen, d. h. mit den von uns hergestellten Lösungen des reinen Körpers und dem Blutplasma. Mit den Serumeiweißkörpern trat es beinahe in keine Beziehung. Die Differenzierungsmöglichkeit mittels der Komplementbindung ist fast absolut. Die beiden Fibrinogene verschiedener Tierarten waren so gut wie gar nicht verwandt.

Das Fibrinogen ist also ein Eiweißkörper, der Arteigenheit besitzt, sich aber von den übrigen Serumeiweißstoffen derselben Art streng unterscheidet. Das Fibrinogen nimmt also im Blutplasma eine Sonderstellung ein, eher eine ausgeprägtere als das Casein sie in der Milch besitzt.

Tabelle I.

Hämolyse bei Einwirkung von 0,1 ccm Rinderfibrinogen-Antiserum auf:

Verdünnungen (je 1 ccm)	Rinderfibrinogen (0,6% Albumen)	Rinderplasma	Rinderserum
1/100	0	0	stark
1/1000	0	0	fast komplett
1/10000	mäßig	0	komplett
1/100000	komplett	wenig	„
1/1000000	„	komplett	„
0	„	„	„

Die Kontrollen ohne Antiserum waren bei den angeführten Mengen der Antigene stets komplett gelöst.

Tabelle II.

Hämolyse bei Einwirkung von 0,1 ccm Rinderfibrinogen-Antiserum auf:

Verdünnungen (je 1 ccm)	Rinder-fibrinogen	Schweine-fibrinogen
$^1/_{10}$	0	komplett
$^1/_{100}$	0	„
$^1/_{1000}$	0	„
$^1/_{10\,000}$	mäßig	„
0	komplett	„

Tabelle III.

Hämolyse bei Einwirkung von 0,05 ccm Rinderserum-Antiserum auf:

Verdünnungen (je 1 ccm)	Rinder-serum	Rinder-plasma	Rinder-fibrinogen	Schweine-plasma	Schweine-fibrinogen
$^1/_{100}$	0	0	mäßig	komplett	komplett
$^1/_{1000}$	0	0	komplett	„	„
$^1/_{10\,000}$	0	0	„	„	„
$^1/_{100\,000}$	fast 0	stark	„	„	„
$^1/_{1000\,000}$	mäßig	komplett	„	„	„
0	komplett	„	„	„	„

Tabelle IV.

Hämolyse bei Einwirkung von 0,1 ccm Schweinefibrinogen-Antiserum auf

Verdünnungen (je 1 ccm)	Schweine-plasma	Schweine-fibrinogen	Schweine-serum	Rinder-plasma	Rinder-fibrinogen
$^1/_{100}$	0	0	komplett	mäßig	mäßig
$^1/_{1000}$	0	0	„	stark	stark
$^1/_{10\,000}$	komplett	komplett	„	komplett	komplett
0	„	„	„	„	„

Tabelle V.

Hämolyse bei Einwirkung von 0,05 ccm Schweineplasma-Antiserum auf:

Verdünnungen (je 1 ccm)	Schweine-plasma	Schweine-fibrinogen	Schweine-serum	Rinder-plasma	Rinder-fibrinogen
$^1/_{100}$	0	0	0	mäßig	mäßig
$^1/_{1000}$	0	fast 0	0	stark	stark
$^1/_{10\,000}$	0	mäßig	0	komplett	komplett
$^1/_{100\,000}$	mäßig	stark	fast 0	„	„
$^1/_{1000\,000}$	fast kompl.	fast kompl.	stark	„	„
0	komplett	komplett	komplett	„	„

Die Präcipitation ergab ganz entsprechende Resultate. Gemäß ihrer geringeren Spezifität zeigte sie eine gewisse Verwandtschaft der Fibrinogene zweier Säuger. Ein geringerer

verwandtschaftlicher Grad kommt auch zwischen dem Fibrinogen und den Bluteiweißstoffen derselben Tierart bei Verwendung dieser Methodik zum Ausdruck. Das demonstriert die Tabelle VI recht anschaulich.

Tabelle VI.

Präcipitation von 0,2 ccm Rinderfibrinogen-Antiserum (B) auf:

Verdünnungen (je 2 ccm)	Rinder-plasma	Schweine-plasma	Rinder-serum	Schweine-serum
1/2	+++	++	0	0
1/4	+++	++	?	0
1/8	+++	++	×	0
1/16	+++	+	+	0
1/32	++	×	+	0
1/64	++	?	+	0
1/128	++	0	+	0
1/256	+	0	+	0
1/512	+	0	×	0
1/1024	+	0	?	0
1/2048	?	0	0	0
1/4096	0	0	0	0
0	0	0	0	0

+++ sehr starke Reaktion
++ starke Reaktion
\+ deutliche „
× schwache „
? fragliche „
0 keine „

Über Glykogenbildung.

Von

Georg Rosenfeld (Breslau).

(Eingegangen am 31. Mai 1912.)

Der Charakter als Glykogenbildner kann nur dann einer Substanz zuerkannt werden, wenn sie gegen einen sonst bekannten Glykogenstatus eine Vermehrung der Glykogenmenge hervorruft. Am einfachsten wäre die Rechnung, wenn man den positiven Glykogenbefund in Vergleich zu O als vorherigem Vorrat setzen könnte. Man hat auch diesen Status von O-Glykogen auf mannigfache Weise herzustellen sich bemüht.

Wie hat man versucht, Hunde durch Hungern glykogenfrei zu machen! Erfolglos. Oder man fügte noch zum Hunger Arbeit hinzu, wodurch eher ein Erfolg erzielt werden konnte, der aber nur ein zweifelhafter blieb.

Auch durch Verwendung von Krampfgiften, wie Strychnin, von Kohlenhydrat entziehenden Mitteln, wie Phlorizin, sollte Glykogenfreiheit erzielt werden.

In der Tat tritt auch eine annähernde vollständige Glykogenfreiheit nach Phlorizin in der Hundeleber auf, aber nach dem Aussetzen des Phlorizins tritt wieder Glykogen in die Leber ein[1]).

[1]) Diese Tatsache habe ich schon vor einer Reihe von Jahren beobachtet und mitgeteilt. Allgem. med. Centralzeitung 1900, Nr. 89. „Vortragender bespricht die Phlorizinvergiftung. Sie führt zur Fettleber und zur Aglykogenie (darunter wird auch hochgradige Armut an Glykogen verstanden). v. Mering und Külz haben Glykogen nur darum in ihren Phlorizinlebern gefunden, weil sie wenig Phlorizin gaben und die Tiere noch 3 bis 5 Tage leben ließen. Dann tritt wieder Glykogen in den Lebern auf.“ — Ebenda. „Auch wenn man Tiere nach Acquisition der Fettleber weiter hungern läßt, verschwindet das Fett, und zwar unter

Dieser Umstand macht es schwierig, mit Tieren, die durch Phlorizin entglykogent sind, zu arbeiten. Und nicht nur dieses nachträgliche spontane Auftreten von Glykogen hindert — man könnte ja versuchen in währender Phlorizinvergiftung den auf Glykogenbildung zu prüfenden Stoff einzufügen —, aber wie uns zahlreiche Erfahrungen nahelegen, gelingt die Glykogenbildung bei gleichzeitiger Phlorizingabe nur schwierig.

Man kann die Leber, die bei Phlorizintieren schon sehr glykogenarm ist, noch ganz von Glykogen befreien, indem man zum Phlorizin Fettnahrung zufügt, dann sind die Lebern ganz und gar glykogenfrei (vgl. Rosenfeld, Über Phlorizinwirkungen. Kongreß f. innere Med. 1893, S. 366, Anm. 2). Aber auch hier würde die Vergiftung (und die Fettnahrung) die Glykogenbildung stören, wenn man an solchen Tieren die Glykogen erzeugende Kraft von Substanzen studieren wollte.

Pflüger hat darauf hingewiesen, daß mit Fett gefütterte Tiere glykogenfreie Lebern haben und für Glykogenstudien in Frage kommen können[1]). Doch auch an diesen Tieren kann man nach meinen Erfahrungen nur durch sehr große Mengen von glykogenbildender Substanz Glykogenablagerung erzwingen. Das ist deswegen a priori verständlich, weil die großen Fettmengen nach meiner Anschauung sehr viel Kohlenhydrate für ihre Entflammung in Anspruch nehmen (vgl. Rosenfeld, Fett und Kohlenhydrate. Berl. klin. Wochenschr. 29, 1906, auch andere noch nicht edierte Versuche).

So schien die Methode, mit Vergleichstieren die Glykogenbildung durch eine Substanz zu studieren, nicht rechten Erfolg zu versprechen. Aber es bestand die Möglichkeit, Teile der Leber desselben Tieres als Testobjekt für den Glykogenanfangs-

---

Auftreten von Glykogen." — Das gleiche siehe Ergebnisse der Physiol. 2, 1902, Teil I, S. 84. „Die Heilung der Fettlebern nach dem Aussetzen des Giftes beruht auf einem Wiederauftreten von Glykogen in der Leber im weiteren Hungerzustande." — Die hier aufgeführte Mitteilung ist Pflüger entgangen, und die Tatsache dann von ihm in Gemeinschaft mit Junkersdorf neu beschrieben worden. Arch. f. d. ges. Physiol. 131.

[1]) Auch diese Tatsache habe ich schon früher beobachtet und in der Form, daß die Bedingung für Fetteinlagerung in die Leber der Mangel von glykogenbildenden Kohlenhydraten in der Nahrung ist, mitgeteilt (vgl. Rosenfeld, Fett und Kohlenhydrate. Berl. klin. Wochenschr. 1906, Nr. 29).

status zu entnehmen und dann an der Ablagerung des Glykogens in der zurückgebliebenen Leber den Unterschied im Glykogengehalte festzustellen.

In diesem Sinne wurden die folgenden Versuche angestellt.

Hund Nr. G 61 wiegt nach 5tägigem Hungern 11 kg.

Am 26. VI. 1907 nachmittags 4 Uhr werden in Chloroformnarkose 5 g Leber abgetragen und sofort gekocht. Alsdann erhält der Hund intravenös 120 g Dextrose in 540 ccm Lösung. Am 27. VI. früh wird der Hund getötet.

Die 5 g abgetragener Leber enthalten 0,64% Glykogen.

Die 50 g nach der Eingabe des Zuckers enthalten 0,34% Glykogen.

Urin, 430 ccm, enthält bei 3,83% = 16,47 g Dextrose.

Rest der Leber 110 g.

Hund Nr. G 62 wiegt nach 5tägigem Hungern 11 kg. Er erhält am 27. VI. 1907 nachmittags von $5\frac{1}{2}$ Uhr an 120 g Dextrose in die Vena jugularis, nachdem in Chloroformnarkose ein Stück Leber galvanokaustisch abgetragen war. Das abgetrennte Stück wog 11 g, von welchen 1 g als Blut auf der Wagschale verblieb, so daß 10 g zur Glykogenbestimmung verwendet wurden. Am 28. VI. morgens wird der Hund getötet.

Leber wiegt 180 g im ganzen, davon 50 g zur Glykogenbestimmung II.

Die 10 g abgetragener Leber enthielten 0,56% Glykogen.

Die 50 g Leber enthielten 0,11% Glykogen.

Die 50 g Muskel enthielten 0,64% Glykogen.

Urin, 500 ccm, enthielt bei 6,21% = 31,05 g Dextrose.

Hund Nr. G 64 wiegt nach 5tägigem Hungern 22 kg am 1. VII. 1907. Am 1. VII. nachmittags wird ein Stück Leber galvanokaustisch abgetragen (22 g), dann Injektion von 250 g Dextrose in 1128 ccm Lösung in die Vena jugularis. Am 2. VII. 7 Uhr wird das Tier getötet. Von der Leber werden 22 g und 50 g zur Glykogenbestimmung verwendet. Der Rest wiegt 310 g, die ganze Leber zusammen 404 g.

Die 22 g abgetragener Leber enthalten 0,15% Glykogen.

Die 22 g nach der Injektion enthalten 0,3% Glykogen.

Die 50 g nach der Injektion enthalten 0,144% Glykogen.

Die 50 g Muskel enthalten 0,68% Glykogen.

Urin, 1050 ccm, enthält bei 5,03% = 52,815 g Dextrose.

Nachdem sich so nach intravenöser Injektion nicht nur keine Glykogenvermehrung, sondern sogar eine deutliche Verminderung in drei Fällen G 61, G 62, G 66 und nur im Falle G 64 eine innerhalb der Fehlergrenzen liegende Vermehrung herausgestellt hatte, mußte der Einwand erwogen werden, ob nicht im Wesen der intravenösen Injektion des Traubenzuckers etwas läge, was die Glykogenbildung verhinderte. Um diesem Ein-

wande zu begegnen, wurde in zwei Versuchen die Dextrose in der gewöhnlichen Weise, per os, gegeben.

Hund Nr. G 67, Schecker, wiegt nach 5tägigem Hungern 15 kg am 9. VII. 1907. Um $3^1/_2$ Uhr wird ein Stück Leber im Gewicht von 20 g in Chloroformnarkose galvanokaustisch abgetragen und 135 g Dextrose per os gegeben, worauf die Speiseröhre unterbunden wird. Am 10. VII. morgens 7 Uhr, ca. 14 Stunden nach der Operation, wird der Hund getötet.

Urin, 25 ccm, enthält bei 0,48 % = 0,24 g Dextrose.

Die Leber wiegt in Summa 320 g.

Abgetrenntes Stück I enthält in 20 g feuchter Substanz 0,0710 g = 0,355 % Glykogen.

50 g nach dem Töten entnommener Leber enthalten 0,09 g = 0,18 % Glykogen.

50 g Muskel enthalten 0,105 = 0,21 % Glykogen.

Hund Nr. G 69 wiegt am 11. VII. 1907 nach 5tägigem Hungern 11 kg. Nachmittags 4 Uhr werden 30 g Leber in Chloroformnarkose galvanokaustisch abgetragen. Der Hund erhält 100 g Dextrose per os, worauf die Speiseröhre unterbunden wird. Am 12. VII. morgens, ca. 14 Stunden nach der Operation, wird der Hund getötet.

Die Leber wiegt in Summa 255 g.

Abgetrenntes Stück enthält in 30 g 0,251 g = 0,837 % Glykogen.

50 g nach dem Töten entnommene Leber enthalten 0,186 g = 0,372 % Glykogen.

Auch hier ist das Resultat, daß nach der Probeexzision keine Glykogenablagerung nachweisbar ist. Es bleibe dahingestellt, ob an diesem Ergebnis die Operation an sich oder die doch für einen so großen Eingriff unerläßliche Chloroformnarkose Schuld trägt. Da sich nun die Methode des Testobjektes als unzulässig erwiesen hatte, mußte doch der Weg der Vergleichstiere als der sonst noch einzig restierende wieder ins Auge gefaßt werden. Freilich glykogenfreie Vergleichstiere für solche Versuche herzustellen war nicht gut angängig — denn entweder führten alle Prozeduren, die Tiere glykogenfrei machten, nach dem Aussetzen der Prozedur zu spontaner Glykogenanhäufung, oder die Fortführung der Prozedur machte Schwierigkeiten in der Glykogenbildung, wie wir oben gesehen haben.

Aber um Vergleiche anstellen zu können, brauchte man schließlich für viele Zwecke nicht glykogenfreie Tiere zum Vergleich — mit dieser Forderung war der Bogen eigentlich überspannt —, es genügte vielmehr bei größeren Ausschlägen der

Glykogenanhäufung, wenn nur die Mengen, die als spontan vorhandener Vorrat vorauszusetzen waren, in ihren Grenzen bekannt waren. Das trifft auch zu. Man muß nur nicht glattweg mit dem Begriff Hungertier rechnen, denn in währendem Hunger steigt der Glykogengehalt, der nach einigen Hungertagen tief gesunken ist, wieder etwas in die Höhe. Und man muß sich auch nicht immer durch die zwei Paradestücke abschrecken lassen, durch das Muskeltrockenpräparat von Pflüger, das, obwohl es von einem 38 Tage hungernden Hunde stammte, nicht ganz unbedeutende Mengen von Glykogen enthielt, und durch den Riesenhund, in dem er nach 28 Tagen Hunger noch 52,5 g Glykogen konstatierte, eine Menge, die, absolut betrachtet, einen Eindruck macht, aber auf das Kilo des 33,6 kg schweren Tieres den ziemlich unbedeutenden Betrag von 1,56 g pro kg und den Prozentsatz von 0,156% darstellt. Diese beiden Raritäten haben vielfach Forscher abgehalten sich der Methode der Vergleichstiere bei Glykogenstudien zu bedienen.

Dabei ist es nur nötig, von einem oder einigen Hungertagen die zu ihnen gehörigen Glykogenmengen zu kennen, um bei Versuchen mit weiten Ausschlägen zu sicheren Ergebnissen zu gelangen.

Für meine Untersuchungen habe ich meistens den fünften Hungertag gewählt, bei dem sich folgende Zahlen ergeben haben:

G 67	0,35%	G 61	0,64%
G 71	0,11%	G 62	0,58%
G 70	1,06%	G 64	0,15%
G 69	0,837%	G 66	0,52%
G 68	0,52%	G 65	0,166%

Genügend Unterlage für die Annahme, daß alles, was über 1% Glykogen in der Leber zeitigt, Glykogenbildner ist. Die Wirkung wird ja nach höchstens 24 Stunden beobachtet. Es handelt sich also nur darum, daß am sechsten Hungertage nicht etwa spontan viel mehr Glykogen in der Leber auftritt. Aber selbst am siebenten Hungertage fand ich nur 1,1% Glykogen.

Methode der Bestimmung.

Auf obige Weise haben wir eine feste Grundzahl für Leberglykogenvergleiche gewonnen und müssen nun noch bei der Methode der chemischen Bestimmung des Glykogens verweilen.

Nachdem Pflüger lange Zeit Zweifel in die so viel geübte Külzsche Bestimmungsmethode gehegt und gesät hatte, und zwar wegen der geringen Widerstandsfähigkeit des Glykogens dünneren KHO-Lösungen gegenüber, ist wohl jetzt Klärung eingetreten.

Es ist gar kein Grund vorhanden die sehr expeditive Külzsche Methode an sich zu verlassen, höchstens könnte man für sie die Variation einführen, daß man stärkere Konzentrationen von KHO anwendet. Dann ist aber selbst den Pflügerschen Einwendungen Genüge getan. Es kommt noch hinzu, daß die Einbuße an Glykogen durch dünnere KHO-Lösungen nur bei sehr outrierter Behandlung von wesentlicher Größe ist.

Ich möchte hier eine sehr einfache Verbesserung der Külzschen Methode angeben, die ich schon vor längerer Zeit ausprobiert habe. Sie besteht darin, daß man die Leber schnell zermahlt und dann statt in Wasser, in Alkohol kocht. Ein großes Reagensglas (oder mehrere), mit Alkohol angefüllt, wird im kochenden Wasserbade in lebhaftem Kochen erhalten, die gewogene Portion Leberbrei (30 g) dazugefügt und das Kochen bis annähernd zum Verdunsten des Alkohols fortgesetzt, dann Lösung in Wasser und KHO usw. nach Külz erschlossen. Die Ausbeute ist nicht unerheblich besser als nach Fixieren in kochendem Wasser.

Ein Beispiel möge genügen.

Hund E mit 200 g Casein und Fett gefüttert, nach 20 Std. getötet.

Leber 170 g hellbraun, sagokörnig, gemahlen, davon 3×20 g zur Glykogenbestimmung.

Methode Brücke-Külz I und II ohne Vorbehandlung.

I. Reinglykogen $3{,}5\,\%$.

II. Reinglykogen $3{,}66\,\%$.

III. 20 g gemahlen, in Alkohol gekocht, dann nach derselben Methode behandelt. Reinglykogen $4{,}1\,\%$.

Eine ähnliche Vorbehandlung hat Wohlgemuth aus dem Salkowskischen Laboratorium angegeben, nur daß dort die Leber kalt mit Alkohol mehrfach behandelt und die Fettextraktion vorausgeschickt wurde.

Die obige Form ist eine sehr einfache, empfehlenswerte Verbesserung der Külzschen Methode. Sie ist übrigens in den

nunmehr anzuführenden Versuchen nicht zur Verwendung gekommen, sondern nur die Külzsche Methode in der alten Form.

Glykogenbildung aus Eiweiß.

Wenn auch die Summe der Einwände, die von der Pflügerschen Schule gegen die Entstehung von Glykogen aus Eiweiß geltend gemacht worden sind, nicht mehr aufrecht gehalten sind, so war es mir doch wichtig, die Bildung von Glykogen aus Eiweiß an sich zu konstatieren und vor allem in ihrem Umfange zu untersuchen.

Zunächst einige Versuche über Glykogenbildung nach Fleisch.

Hund A hungert 5 Tage bis 27. II. 1893. Er erhält am 28. II. 150 g Fleisch, am 1. III. 550 g Fleisch. Gewicht 2. III. 4100 g. Leber feucht 115 g. 25 g enthalten 1,538 g aschehaltiges Glykogen = 6,2% der frischen Leber. In der ganzen Leber ca. 7 g Rohglykogen.

Hund B wiegt am 10. XI. 1902 12,2 kg, hungert vom 12. XI. bis 16. XI. Er erhält am 16. XI. 2000 g Pferdefleisch und wird am 17. XI. mittags durch Verbluten getötet. Magen enthält noch reichlich Fleisch. Leber 300 g, enthält 3,13% Reinglykogen.

Hund C wiegt am 11. XI. 1902 13,7 kg, hungert und erhält am 18. und 19. XI. je 1500 g, am 20. XI. 2000 g Pferdefleisch und wird am 21. XI. mittags durch Verbluten getötet. Leber 320 g, enthält 5,55% Reinglykogen.

Es ist gegen derartige Versuche eingewendet worden, daß die im Fleisch enthaltenen Glykogenmengen das in der Leber des Futtertieres sich findende Glykogen erzeugt haben könnten. Bei den Minima von Glykogen, die im Versuch A, Fütterung mit 700 g Fleisch mit höchstens 3 g Glykogen, zur Verfügung stehen, können sie füglich ganz außer Berechnung bleiben. Wenn man selbst die 5fache Menge Zucker zufügen würde, so wäre die Erhöhung der Glykogenmenge auch noch unbedeutend. So ist es keine Frage, daß aus den Eiweißkörpern des Fleisches Glykogen entsteht.

Noch reiner ist der Erfolg der Versuche mit Casein.

Hund H 9 erhält nach 6tägigem Hunger am 25. X. 1907 abends 7 Uhr 120 g Casein. Morgens 8 Uhr (nach 13 Stunden) getötet. 8400 g Gewicht. Leber 179 g, enthält 2,373% Glykogen (4,3 g in der ganzen Leber).

Hund H 10 erhält vormittags 11 Uhr und abends 7 Uhr (28. X. 1907) in Summa 220 g Casein. Leber 262 g, enthält 4,71% Glykogen (12,2 g in der ganzen Leber).

Hund H 16. Nach 5tägigem Hunger erhält er am 4. X. 1907 2 × 100 g Casein. Am 5. X. morgens 8 Uhr getötet. Leber 265 g, enthält 2,93% Glykogen (in der Leber ca. 7,5 g).

Hund H 58. Gewicht 5 kg nach 5tägigem Hungern. Er erhält am 18. II. 1908 100 g Casein. 19. II. morgens 8 Uhr getötet. Leber 177 g, enthält 2,4% Glykogen, in der ganzen Leber 4,3 g.

Hund H 60 wiegt am 7. Hungertage 6 kg, erhält 120 g Casein 6 Uhr abends, 13 Stunden später getötet. Leber 175 g, enthält 2,08% Glykogen, in der ganzen Leber ca. 3,6 g.

Die Glykogenbildung nach Casein ist unverkennbar, die Versuche von Bendix sind also voll bestätigt.

Die Menge des Glykogens aber, das aus Fleisch und aus Casein entsteht, entspricht nicht im entferntesten den großen Mengen der Zufuhr.

Glykogenbildung aus Traubenzucker.

Nunmehr wenden wir uns zu den Versuchen, die den Zweck haben, die Glykogenbildung aus Traubenzucker in der Leber zu untersuchen nach der Art der Einbringung: eine Reihe von Versuchen mit oraler und eine andere Reihe mit intravenöser Zufuhr des Traubenzuckers sollen zeigen, in welchen Prozentmengen und in welchen Zeiten die Glykogenbildung nach beiden auftritt.

Eine Aufführung der Versuche im einzelnen ist nicht nötig. 5 Tage Hunger gehen jeder Fütterung voran. Die Menge ist bei den oralen Versuchen immer 8 g Traubenzucker pro kg Hund.

1. Nach oraler Zufuhr.

J. 71, J. 76	3 Std.	nach d. Fütterung	11,5% / 7%
J. 75	5 „	„ „ „	22%
J. 72, J. 79, J. 80	6 „	„ „ „	10,7% / 12% / 10%
J. 73	9 „	„ „ „	12%
J. 98, J. 94, J. 95	12 „	„ „ „	10% / 14% / 15,6%
J. 82, J. 83	16 „	„ „ „	9% / 9%

der eingeführten Zuckermenge als Glykogen angesetzt

2. Nach intravenöser Zufuhr.

Auch hier ist eine detaillierte Schilderung wohl entbehrlich: es sind immer 11 g pro Kilogramm in 20%iger Lösung ge-

wöhnlich in die Vena jugularis eingelassen worden, immer mit derselben Vorwärmung, etwas wechselnd in der Geschwindigkeit, meist in ca. 1 Stunde. Die Zeiten sind nach Beendigung des Einlaufs gerechnet.

H. 67	2 Std. nach Ende des Einlaufs	11 %	der eingeführten Zuckermenge als Glykogen angesetzt
H. 64		8 %	
H. 63	2½ „ „ „ „ „	9 %	
H. 81		14 %	
H. 83	3 „ „ „ „ „	11 %	
H. 68		9 %	
H. 84	6 „ „ „ „ „	15 %	
H. 82		13 %	
H. 85	9 „ „ „ „ „	3 %	
G. 50	5–10 Std. nach Ende d. Einlaufs	3,3 %	
G. 55	8–12 „ „ „ „ „	Spuren	
G. 53	10–14 „ „ „ „ „	4,5 %	do.
G. 58	14 „ „ „ „ „	0,3 %	
J. 67	15 „ „ „ „ „	Spur	
J. 64		Spur	
J. 65	15 „ „ „ „ „	3 % (durch die V. lienalis)	
J. 52	20 „ „ „ „ „	Spur (durch die V. mesent.)	

Man sieht also, daß die orale Dextrosezufuhr mehr Glykogen — bis 22 % der eingeführten Dextrosemenge — bewirkt, das nach 16 Stunden noch in reichlichen Mengen vorhanden ist, während der intravenös eingelassene Traubenzucker nur bis 15 % höchstens als Glykogen angesetzt wird, wobei dieses Glykogen schon nach 10 Stunden bis auf geringe Mengen zurückgegangen ist.

Anhangsweise seien noch zwei Zahlen über das Verhalten der d-Fruktose bei intravenöser Zufuhr gegeben.

L. 39	nach 5 Stunden . .	21 % der eingeführten Lävulose als Glykogen angesetzt.
L. 44	nach 10 Stunden .	15,6 %

Über die Fettbestimmung nach dem Prinzip der direkten Verseifung.

Von

S. Székely.

(Eingegangen am 17. Juni 1912.)

Vor einigen Jahren (diese Zeitschr. 8, 218, 1908) haben Kumagawa und Suto auf Grund sehr genauer Arbeiten eine Modifikation der Liebermann-Székelyschen Fettbestimmungsmethode publiziert. Ich will an dieser Stelle nicht untersuchen, ob sie beträchtlich genauer ist, als die ursprüngliche, jedenfalls ist sie bedeutend umständlicher und, wie mir scheint, für die Praxis weniger geeignet. Kumagawa und Suto haben allerdings gefunden, daß nach der direkten Verseifung nach Liebermann-Székely, auch aus anderen vorhandenen Stoffen als Fetten (Eiweißkörper) kleine Mengen ätherlöslicher Körper entstehen (was auch Liebermann schon früher gefunden hat) und daß der Extrakt selbst eine etwas verschiedene Zusammensetzung hat, woraus geschlossen werden könnte, daß die Methode etwas zu hohe oder sonst nicht ganz richtige Resultate gibt. Indessen scheinen die Bestimmungen von Kumagawa und Suto selbst dem zu widersprechen, denn die vergleichenden Versuche nach beiden, im Prinzipe gleichen Methoden gaben gut übereinstimmende Werte. Kumagawa und Suto (l. c. S. 311) haben vergleichende Versuche (mit einem etwas modifizierten Liebermann-Székelyschen Kolben) angestellt und in einem Fleischpulver nach unserer Methode 7,425 %, nach ihrer Modifikation aber 7,486 % gefunden. In der Tat liegt ja bei den meisten analytischen Methoden die Sache so, daß es nicht darauf ankommt, den zu bestimmenden Bestandteil völlig frei von jeder Verunreinigung und in einer Menge zu bekommen, die der theoretischen ganz genau entspricht (selbst bei den

allergenauesten Methoden der Mineralanalyse ist das nur selten der Fall), sondern das Wesentliche einer guten Methode besteht darin, daß sich die verschiedenen unvermeidlichen Fehler so kompensieren, daß das Endresultat ein richtiges ist. Das scheint nun bei der Liebermann-Székelyschen Methode bei Fleisch usw. der Fall zu sein. Aber nicht das ist es, was ich heute diskutieren will. Ich möchte aus Anlaß einer jüngst erschienenen Arbeit von Rinji Watanabe (diese Zeitschr. **41**, 71) nur in Erinnerung bringen, daß das Prinzip der direkten Verseifung zum Zwecke einer genauen Fettbestimmung, auf dem die erwähnte Modifikation beruht, dasjenige ist, das vor Jahren von Liebermann und Székely (Eine neue Methode der Fettbestimmung usw., Arch. f. d. ges. Physiol. **72**, 360, 1898 und **108**, 481, 1905) zuerst eingeführt und angewendet wurde, was Kumagawa und Suto in ihren Arbeiten angeführt haben.

Wir glauben nicht, daß die Methode einfach Methode Kumagawa-Suto genannt werden könnte. Anderseits scheint es uns auch kaum zweckmäßig, sie mit vier Namen zu benennen. Das einzig richtige scheint uns, sie als direkte Verseifungsmethode zu bezeichnen und je nachdem man nach der ursprünglichen Vorschrift oder nach der Modifikation arbeitet, dies noch besonders anzugeben.

Über Änderungen der Komplement-Komponenten (Mittelstück und Endstück) durch die Einführung von Lecithin in komplementhaltiges Serum.

Von

J. Cruickshank, M. B., Ch. B. und **T. J. Mackie**, M. B., Ch. B.

(Aus dem pathologischen Laboratorium der Universität und des Western Infirmary, Glasgow.)

(Eingegangen am 17. Juni 1912.)

Im Laufe einer Reihe von Versuchen über den Einfluß der Einführung von Lipoiden in komplementhaltiges Serum wurde die Beobachtung gemacht, daß die Zufügung von Lecithin eine erhebliche Änderung der Eigenschaften der Komponenten bewirkt, die man durch Spaltung des komplementhaltigen Serums mittels Kohlensäure erhält.

Es ergab sich, daß die Albuminfraktion (Endstück) eines mit Lecithin behandelten Serums bei der Hämolyse ebenso wirksam ist, wie das ganze native Serum, während der Globulinteil (Mittelstück) die Fähigkeit, das gewöhnliche Endstück zu ergänzen, beibehält.

Eine 9%ige Lösung von Eierlecithin in Alkohol (nach der Methode von Browning, Cruickshank und Mackenzie hergestellt) wurde rasch mit frischem Meerschweinchenserum gemischt (0,15 ccm Lecithinlösung zu 10 ccm des zehnfach mit destilliertem Wasser verdünnten Serums). Es resultierte eine trübe Emulsion, deren hämolytische Wirkung für die mit fünf Dosen eines Kaninchen-Immunkörpers sensibilisierte Ochsenblutkörperchenaufschwemmung gleich derjenigen des ursprünglichen Serums war. Das Mittel- und Endstück wurden durch Einleitung von Kohlensäure bereitet, und als Kontrolle wurde ein Teil desselben unbehandelten Serums in gleicher Weise ge-

spalten. In allen Versuchen übten die Fraktionen des unbehandelten Serums an und für sich im Vergleich mit dem nativen Serum fast keine hämolytische Wirkung aus, während ein Gemisch von beiden Portionen fast ebenso wirksam wie das letztere war. Im Falle des Lecithinserums war das Endstück, das die Trübung der gesamten Lecithinserumverdünnung behält, von der gleichen Wirksamkeit wie das native Serum, während sich das Mittelstück an und für sich als unwirksam erwies. Jedoch reichte das Lecithinmittelstück ebensogut wie das gewöhnliche Mittelstück zur Restitution der Komplementwirkung zusammen mit dem gewöhnlichen Endstück aus. Es ergibt sich also in klarer Weise, daß die Zufügung von Lecithin zu dem frischen Serum nicht einfach in der Art wirkt, daß die Eigenschaften des Mittelstücks mit dem Endstück in der Albuminfraktion kombiniert sind.

Die Zugabe von Lecithin zu dem isolierten Endstück bewirkte dagegen keine Erhöhung der Wirkung.

Kontrollversuche wurden mit Alkohol anstatt Lecithin angestellt; diese zeigten, daß die Lecithinwirkung nicht auf dem als Solvens gebrauchten Alkohol beruht.

Ähnliche Resultate wurden mit Kaninchenserum erzielt. Das Endstück von Lecithinkaninchenserum vertritt quantitativ das gewöhnliche Meerschweinchenendstück bei seiner Wirkung im Verein mit Meerschweinchenmittelstück. Das gewöhnliche Kaninchenendstück entbehrte, in Bestätigung der Resultate anderer Beobachter, jeder Wirkung bei der Prüfung mit dem Mittelstück (Meerschweinchen und Kaninchen). Die Komplementwirkung der Fraktionen des Lecithinserums sowie des gewöhnlichen Serums wurden durch $^1/_2$stündige Erhitzung auf 54° C vernichtet.

Zusammenfassung.

1. Die Zufügung von Lecithin zu Meerschweinchen- und Kaninchenserum übt keinen Einfluß auf die hämolytische Wirkung aus.

2. Das Lecithinendstück von Kaninchen- und Meerschweinchenserum besitzt quantitativ dieselbe hämolytische Wirkung wie das gesamte native Serum; das Lecithinmittelstück behält zur gleichen Zeit seine Wirksamkeit und kann das gewöhnliche

Mittelstück bei seiner Wirkung mit dem gewöhnlichen Endstück vertreten.

3. Die Zufügung von Lecithin zu dem gewöhnlichen Endstück (nach der Spaltung des Serums) übt keine Wirkung aus.

4. Das Endstück des Lecithinkaninchenserums vertritt quantitativ das gewöhnliche Meerschweinchenendstück bei dem Zusammenwirken mit dem gewöhnlichen Meerschweinchenmittelstück. Die Wirksamkeit des Lecithinkaninchenendstücks erweist sich derart als eine sehr viel höhere als diejenige des nativen Kaninchenserums.

Zusatz bei der Korrektur:

Das Lecithinendstück wird nach der Absorption mit sensibilisierten Stromata bei 37° C durch das gewöhnliche Mittelstück reaktiviert.

Sensibilisierte Blutkörperchen entfernen bei 0° C aus der Lecithinendstücklösung eine mittelstückähnliche Komponente (bewiesen durch: 1. Reaktivierung der Flüssigkeit durch das gewöhnliche Mittelstück; 2. Hämolyse der behandelten [persensibilisierten] Blutkörperchen durch den Zusatz des gewöhnlichen Endstückes).

Zur Kenntnis der Spezifitätserscheinungen bei der Phenolasewirkung.

Von

A. Bach und V. Maryanovitsch.

(Aus A. Bachs Privatlaboratorium und dem Universitätslaboratorium, Genf.)

(Eingegangen am 29. Mai 1912.)

Gelegentlich einer Untersuchung über das Verhalten der Phenolase aus Pilzen gegen Säuren stellten A. Bach und B. Sbarsky[1]) fest, daß die Säuremengen, die zur vollen Lähmung einer gegebenen Fermentmenge erforderlich sind, sowohl von der Fermentkonzentration, wie von der Natur des zu oxydierenden Substrates abhängig sind.

So wurde z. B. die „tödliche" Schwefelsäuredosis für 0,5 mg Phenolase bei der Oxydation von 0,2 g Pyrogallol in 30 ccm zu 16,7 mg H_2SO_4 ermittelt. Unter sonst gleichen Bedingungen waren zum Aufheben der Wirkung von 10 mg Phenolase nicht 334 mg, sondern nur 85,7 mg Schwefelsäure erforderlich. Als tödlich für 20 mg Phenolase bei der Oxydation äquivalenter Mengen Hydrochinons, Pyrogallols und Guajacols erwiesen sich 98 mg im ersten Falle, 134 mg im zweiten und 245 mg Schwefelsäure im dritten.

Die Wirksamkeit der Phenolase wächst bekanntlich langsamer als die Fermentkonzentration. Andererseits gestaltete sich die Wirksamkeit des Fermentes den untersuchten Phenolen gegenüber derartig, daß Guajacol am schnellsten, Pyrogallol langsamer und Hydrochinon noch langsamer der Oxydation unterlagen. Daraus ergibt sich, daß die tödlichen Säuremengen nicht den absoluten Fermentmengen, sondern der Wirksamkeit der Phenolase bei den gegebenen Versuchsbedingungen (Fermentkonzentration und Natur des Substrates) proportional sind.

Aus diesen Ergebnissen zogen Bach und Sbarsky den Schluß, daß bei der Einwirkung von Säuren auf Phenolase komplizierte Erscheinungen auftraten, die im Gegensatz zu der

[1]) Diese Zeitschr. **34**, 473, 1911.

Ansicht von G. Bertrand[1]) nicht auf die „Neutralisation" des schwach gebundenen Mangans oder irgendeines anderen Metallsalzes zurückzuführen sind.

Sucht man nach einer Erklärung der von Bach und Sbarsky festgestellten Tatsachen, so findet man, daß hier zwei Möglichkeiten vorliegen:

1. Die beobachteten Unterschiede sind durch die Eigenschaften der Substrate bedingt, deren Oxydationsfähigkeit durch Säuren in ungleicher Weise beeinflußt wird.

2. Das als Phenolase bekannte Ferment enthält mehrere spezifisch wirkende Fermente, die sich gegen gleiche Säuremengen verschieden verhalten.

Um der Entscheidung der Frage auf experimentellem Wege näher zu kommen, stellten wir einerseits Versuche über das Verhalten der Phenolase gegen einige Salze bei der Oxydation verschiedener Substrate an. Die Verhältnisse gestalten sich hierbei insofern günstig, als durch Salze die Phenolase nicht so heftig beeinflußt wird wie durch Säuren. Andererseits versuchten wir, die vermutlichen spezifischen Fermente direkt zu isolieren, bzw. deren Existenz nachzuweisen.

1. Verhalten der Phenolase gegen einige Metallsalze.

Der Zweck dieser Versuche war die Ermittlung der Beeinflussung der Phenolasewirkung durch verschiedene Salze bei der Oxydation gleicher Substrate uud durch gleiche Salze bei der Oxydation verschiedener Substrate. Die Versuche wurden mit folgenden Substraten und Salzen ausgeführt:

Substrate: Guajacol, Hydrochinon, Orcin, Pyrogallol, α-Naphthol + Paraphenylendiamin (Röhmann-Spitzersches Reagens).

Salze: Calciumchlorid, Calciumacetat, Zinksulfat, Zinkacetat, Mangansulfat, Manganacetat, Aluminiumsulfat. Eisensalze wurden nicht angewendet wegen der Färbungen, die sie mit den Substraten zum Teil direkt geben, wodurch die colorimetrische Verfolgung des Reaktionsverlaufes gestört wird.

Die Phenolase wurde aus Pilzen (Lactarius vellereus) nach einer etwas abgeänderten Methode dargestellt. Da uns daran lag, eine möglichst einheitliche, tyrosinasefreie Phenolase für die Versuche anzuwenden, wurde der Pilzbrei mit dem gleichen Volumen auf 70° erhitztem reinem Wasser in einer geräumigen Schale vermischt und das Gemisch im Wasserbad bei der angegebenen Temperatur noch

[1]) Compt. rend. 115, 340; Annales de l'Inst. Pasteur 21, 673, 1907.

3 Minuten unter stetigem Umrühren erhitzt. Die Tyrosinase ging dabei völlig zugrunde, der erhaltene Extrakt war aber entschieden der phenolasereichste unter denjenigen, die der eine von uns (B.) in seiner langen Erfahrung je in den Händen gehabt hat. 1 Tropfen des Extraktes rief in 5 ccm 2%iger Guajacollösung augenblicklich eine tiefrote Färbung und bald darauf die Bildung eines braunroten Niederschlages hervor. Mit dem Röhmann-Spitzerschen Reagens entstand augenblicklich Indophenol. Mit Pyrogallol konnte schon nach 3 Minuten reichliche Purpurogallinbildung beobachtet werden. Die außerordentliche Wirksamkeit des Extraktes erklärt sich wahrscheinlich dadurch, daß durch kurzes Erhitzen des Pilzbreies bei weitem mehr aktive Phenolase aus ihrem Zymogen entsteht, als durch Hitze zerstört wird.

Der durch ein Tuch gepreßte Extrakt wurde mit 2% Magnesiumsulfat und, nach Auflösung des Salzes, mit dem gleichen Volumen starkem Alkohol versetzt, der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das klare Filtrat wurde mit 3 Volumen 98%igem Alkohol gefällt. Die Fällung wurde an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, mit starkem Alkohol nachgewaschen und im Vakuum über Chlorcalcium getrocknet. Die trockene graulich-weiße Masse wurde in wenig Wasser gelöst, vom unlöslichen abfiltriert und dann weiter wie oben behandelt. In dieser Weise wurde ein leichtes, fast weißes, völlig wasserlösliches Pulver erhalten, das sämtliche oxydierende Eigenschaften des ursprünglichen Extraktes besaß.

Zur Beurteilung der Beeinflussung der Phenolasewirkung durch verschiedene Salze bei der Oxydation verschiedener Substrate war es unbedingt nötig, eine einheitliche, auf alle Fälle anwendbare, quantitative Untersuchungsmethode auszuarbeiten. Als zweckmäßig erwies sich nach einigen Vorversuchen folgende Methode:

Eine Reihe von etwa 100 ccm fassenden, mit 2fach durchbohrtem Kautschukpfropfen und Zu- und Ableitungsröhren versehenen Erlenmeyer-Kolben wurden mit je 50 ccm einer Lösung, die Ferment, Substrat und Salz in bestimmten Mengen enthielt, beschickt und bei gewöhnlicher Temperatur mit einem gleichmäßigen, reinen Luftstrom behandelt. Die Phenolasemenge betrug in jedem Fall 5 mg; die Substratmenge betrug 0,002 g/Mol., die Salzmengen schwankten von 0,0002 bis 0,001 g/Äquiv.[1]) Um Störungen bei den colorimetrischen Bestimmungen zu vermeiden, wurden die Ferment- und Substratkonzentrationen so gewählt, daß während der Versuchsdauer in der Reaktionsflüssigkeit nur lösliche Oxydationsprodukte sich bildeten. Der Verlauf der Oxydationsprozesse wurde auf colorimetrischem Wege an den Färbungsintensitäten der Reaktionsflüssigkeiten messend verfolgt, wobei als Normalfärbung diejenige

[1]) Dem Röhmann-Spitzerschen Reagens wurde zur Zerlegung des angewandten Paraphenylendiaminchlorhydrates die äquivalente Menge Natriumcarbonats zugesetzt.

angenommen wurde, die bei der Einwirkung von 5 mg Phenolase auf 0,002 g/Mol. Substrat in 50 ccm ohne jeden Salzzusatz entstand. Die Bestimmung der Färbungsintensitäten geschah in der Weise, daß aus den Reaktionsflüssigkeiten herausgenommene Proben in Colorimeterröhren gegeben und aus einer Bürette mit reinem Wasser bis zur Ausgleichung der Färbungsintensitäten versetzt wurden, wobei natürlich die Probe mit der geringsten Färbungsintensität als Vergleichsflüssigkeit diente. Aus den zugesetzten Wassermengen ließen sich die relativen Färbungsintensitäten berechnen. Die Resultate wurden auf die Normalfärbung (= 1) umgerechnet. Je nach der Geschwindigkeit der Oxydationsprozesse schwankte die Versuchsdauer meistens zwischen 1 und 6 Stunden. Bei der Wiederholung der Bestimmungen zu verschiedenen Zeiten wurden stets gut vergleichbare Resultate erhalten. Zur Kontrolle wurden in jeder Reihe Versuche mit inaktiver (gekochter) Phenolase unter Salzzusatz (0,001 g/Äquiv.), mit der gleichen Salzmenge ohne Phenolasezusatz und mit dem Substrat für sich allein (weder Ferment- noch Salzzusatz) angestellt. Zu erwähnen ist noch, daß für sämtliche Versuche chemisch reine, von Kahlbaum bezogene Präparate angewandt wurden.

Das von uns gewonnene Zahlenmaterial soll an einem anderen Orte ausführlich veröffentlicht werden. Hier wollen wir nur zur Erläuterung der Untersuchungsmethode zwei Versuchsreihen angeben und dann die Hauptergebnisse summarisch mitteilen.

Beeinflussung der Phenolase durch Zinksulfat und Mangansulfat.

5 mg Phenolase, 0,002 g/Mol. Substrat, 0,0002 bis 0,001 g/Äquiv., Salz in 50 ccm.

Färbungsintensitäten:

Substrate	Normalfärbung	g/Äquiv. Salz			Kontrollversuche		
		0,0002	0,0006	0,001	a	b	c
A. Zinksulfat							
Guajacol	1,00	1,24	1,42	1,40	0	0	0
Hydrochinon . . .	1,00	0,82	0,75	0,73	0	0	0
Pyrogallol	1,00	0,54	0,54	0,54	0,25	0,21	0,15
Orcin	1,00	0,73	0,66	0,66	0	0	0
α-Naphthol—p-Phenylendiamin . .	1,00	1,32	1,54	2,00	bräunlich	bräunlich	bräunlich
B. Mangansulfat							
Guajacol	1,00	0,92	0,78	0,71	0	0	0
Hydrochinon . . .	1,00	1,20	1,40	1,80	1,52	1,48	0
Pyrogallol	1,00	0,78	0,78	0,78	0,35	0,35	0,35
Orcin	1,00	4,40	6,00	6,60	2,14	1,08	0
α-Naphthol+p-Phenylendiamin . .	1,00	1,16	1,26	1,80	0,83	0,71	0,58

Kontrollversuche:

a) Inaktive Phenolase + 0,001 g/Äquiv. Salz.
b) 0,001 g/Äquiv. Salz.
c) Substrat für sich allein.

In nachstehender Tabelle ist die maximale Beeinflussung der Phenolase durch die untersuchten Salze bei der Oxydation der Substrate, auf die Normalfärbung bezogen, in Prozenten angegeben, wobei + die Zunahme, — die Abnahme der Normalfärbung bezeichnet. Bei der Berechnung der Resultate wurden die bei den Kontrollversuchen ermittelten Werte in Abzug gebracht.

Zu- und Abnahme der Färbungsintensitäten unter dem Einflusse der Salze.

Substrat	Calciumchlorid %	Calciumacetat %	Zinksulfat %	Zinkacetat %	Mangansulfat %	Manganacetat %	Aluminiumsulfat %
Guajacol	— 74	— 42	+ 42	+ 142	— 22	— 5	— 57
Hydrochinon	+ 32	+ 52	— 27	+ 136	— 32	+ 120	— 32
Pyrogallol	— 20	— 43	— 71	+ 136	— 57	— 66	+[1]
Orcin	+ 234	+ 540	— 34	— 44	+ 346	+ 660	— ∞
α-Naphthol + p-Diphenylendiamin . . .	+ 12	+ ∞	+ 100	+ ∞	— 3	+ ∞	+ 80

Aus diesen Zahlen ist klar ersichtlich, daß für die Beeinflussung der Phenolasewirkung durch Metallsalze die Natur der zu oxydierenden Substrate maßgebend ist. Unter sonst durchaus gleichen Bedingungen wirkt z. B. Calciumchlorid bei der Oxydation des Guajacols hemmend (— 74 %), bei der des Orcins fördernd (+ 234 %). Zinksulfat wirkt dagegen fördernd bei der Oxydation des Guajacols (+ 42 %) und hemmend bei der des Orcins (— 34 %). Aluminiumsulfat wirkt fördernd bei der Oxydation des Pyrogallols und des

[1]) Unter dem Einflusse des Aluminiumsulfats färben sich die Oxydationsprodukte des Pyrogallols intensiv orangerot. Diese Färbung ist aber mit der gelbbraunen Normalfärbung colorimetrisch nicht vergleichbar. Auf nicht oxydiertes Pyrogallol ist Aluminiumsulfat ohne Einwirkung. (Vgl. A. Bach, Berichte **43**, 366, 1910.)

Röhmann-Spitzerschen Reagens, hemmend bei der Oxydation des Guajacols und des Hydrochinons und hebt vollständig die des Orcins auf, usw.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse hat man in erster Linie die Änderung des Zustandes der Reaktionsflüssigkeiten durch die Salzzusätze zu berücksichtigen. Bertrand[1]) hat bewiesen, daß die Wirksamkeit der Mangansalze bei der Oxydation des Hydrochinons durch den Luftsauerstoff mit ihrer hydrolytischen Spaltbarkeit zunimmt. So erwies sich z. B. Manganacetat unter sonst gleichen Bedingungen als etwa 9mal wirksamer als Mangansulfat. J. Wolff[2]), der den Einfluß verschiedener Salze auf die Luftoxydation einiger Phenole untersuchte, fand, daß Dinatriumphosphat und Trinatriumcitrat in ähnlicher Weise wie Manganacetat die Oxydation des Hydrochinons beschleunigen. Die Wirksamkeit dieser Salze war aber nicht ihrer hydrolytischen Spaltbarkeit proportional. Dinatriumphosphat übte die geringste Wirkung aus, obgleich es beträchtlich leichter hydrolysiert wird, als die beiden übrigen Salze. Trinatriumcitrat und Manganacetat weisen eine gleiche Hydrolysierbarkeit auf, letzteres beschleunigt aber die Oxydation des Hydrochinons bei weitem kräftiger als ersteres. Wolff äußert daher die Ansicht, daß bei der Beurteilung des Einflusses der Salze auf die Luftoxydation der Phenole nicht alles der hydrolytischen Spaltung zuzuschreiben ist, daß hier auch andere Faktoren mit ins Spiel kommen.

Betrachtet man nun die von uns ermittelte Beeinflussung der Phenolasewirkung vom Standpunkt der hydrolytischen Spaltbarkeit der betreffenden Salze, so ergibt sich, daß hier zwischen Hydrolyse und Beeinflussung kein direkter Zusammenhang besteht. Zwar wirken im allgemeinen Acetate kräftiger als Chloride oder Sulfate, die hydrolytische Spaltbarkeit eines Salzes ist aber für die Beförderung der Phenolasewirkung noch nicht ausschlaggebend. Bei der Oxydation des Pyrogallols z. B. übt Calciumacetat einen größeren hemmenden Einfluß aus (— 43%) als Calciumchlorid (— 20%), Manganacetat einen größeren (— 66%) als Mangansulfat (— 57%), dagegen wirkt

[1]) Compt. rend. **124**, 1355; Bull. Soc. Chem. **17**, 153, 1897.
[2]) Contrib. à la connaiss. de phén. oxydas. art. et nat. 1910.

Zinkacetat stark fördernd (+ 136 %), während Zinksulfat die Oxydation des Pyrogallols hemmt (— 71 %). Bei der Oxydation des Orcins wirken Calcium- und Mangansalze stark fördernd, wobei die Acetate etwa 2mal wirksamer sind als die Chloride und Sulfate; dagegen wirkt hier Zinksulfat etwas weniger hemmend (— 34 %) als Zinkacetat (— 44 %). Das hydrolytisch leicht spaltbare Aluminiumsulfat wirkt nur bei der Oxydation des Pyrogallols und des Röhmann-Spitzerschen Reagens fördernd, in den übrigen Fällen hemmend. Die soeben erwähnte Schlußfolgerung Wolffs ist also auch für die Beeinflussung der Phenolasewirkung richtig.

Bei seinen Versuchen über „künstliche Oxydasen", d. h. über die Beeinflussung der freiwilligen Oxydation der Phenole durch verschiedene Salze, machte weiter Wolff[1]) die sehr interessante Beobachtung, daß kolloidales Eisenferrocyanid die Oxydation des Brenzcatechins in Gegenwart von Trinatriumcitrat beschleunigt, nicht aber die des Hydrochinons. Unter gleichen Bedingungen zeigen Manganverbindungen ein entgegengesetztes Verhalten — sie beschleunigen die Oxydation des Hydrochinons und sind ohne Einwirkung auf die des Brenzcatechins. Wolff hebt mit Recht die Wichtigkeit dieser Beobachtung für die Kenntnis der Spezifitätserscheinungen bei der katalytischen Oxydation der Phenole hervor.

Die von uns erhaltenen Resultate (vgl. obige Tabelle) weisen in sehr ausgeprägter Weise derartige Spezifitäten bei der Beeinflussung der Phenolasewirkung durch verschiedene Salze auf. Die Kontrollversuche ergaben dabei, daß die Spezifitätserscheinungen schon bei der freiwilligen Oxydation der Substrate in Abwesenheit von Phenolase auftreten.

Diese Verhältnisse sprechen entschieden gegen die Annahme, daß die verschiedene Beeinflussung durch ein und dasselbe Salz bei der Oxydation verschiedener Substrate auf die Existenz spezifisch wirkender Phenolasen, die sich gegen Salze (und Säuren) verschieden verhalten, zurückzuführen sei. In Übereinstimmung mit den Tatsachen ist vielmehr anzunehmen, daß es die Substrate sind, die sich gegen Salze und chemische Reagenzien überhaupt verschieden verhalten, wodurch die Ge-

[1]) l. c. 51.

schwindigkeit ihrer freiwilligen Oxydation, d. h. die Grundreaktion, in einem oder anderem Sinne beeinflußt wird. Die Phenolase kann hier nur gewissermaßen als Multiplikator der ursprünglichen Geschwindigkeit fungieren, insofern sie selbst durch das Salz nicht geschädigt wird. Die beobachteten Spezifitäten sind daher als Eigenschaften der Substrate und nicht der Phenolase anzusehen.

Was die Ursache der spezifischen Beeinflussung der untersuchten Substrate durch Salze anbelangt, so liegen zur Erörterung derselben einige Anhaltspunkte vor. Von Weinland und Binder[1]) ist jüngst bewiesen worden, daß Brenzcatechin mit Ferriacetat in Gegenwart von Kalilauge eine komplexe Verbindung $Fe(C_6H_4O_2)_3K_3, 2H_2O$ bildet. Ähnliche Verbindungen lassen sich mit Aluminium-, Cupri-, Nickel-, Kobalt- und Manganosalzen darstellen. Auch Pyrogallol, Gallussäure, Salicylsäure und Protocatechusäure gaben mit Eisensalzen derartige Komplexe. Angenommen, daß Phenole mit Salzen auch in Abwesenheit von Kalilauge sich verbinden, ist es wohl denkbar, daß je nach der Natur der Phenole und der Salze die Eigenschaften der entstehenden Komplexe, darunter auch ihre Oxydierbarkeit, mehr oder weniger weitgehende Veränderungen erfahren. Für das Zustandekommen und den Umfang der Phenolasewirkung wären dann die Eigenschaften dieser Komplexe und nicht die der ursprünglichen Phenole ausschlaggebend. Jedenfalls, ob diese Erklärungsweise sich als zutreffend erweist oder nicht, geht aus den im obigen erörterten Verhältnissen mit genügender Klarheit hervor, daß zu der Annahme mehrerer spezifisch wirkenden Phenolasen keine Veranlassung vorliegt.

2. Versuche, spezifisch wirkende Phenolasen direkt zu isolieren bzw. deren Existenz nachzuweisen.

Um diese Schlußfolgerung weiter zu kontrollieren, versuchten wir, die in der Phenolase etwa enthaltenen spezifischen Arten direkt zu isolieren bzw. deren Existenz nachzuweisen. In der Literatur findet man mehrere Angaben betreffend die Existenz spezifisch wirkender Phenolasen. Von Bourquelot[2])

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 148, 1912.
[2]) Soc. biol. **1896**, S. 896.

ist die Beobachtung gemacht worden, daß Kartoffelsaft, der sämtliche Phenolasereaktionen aufweist, auf Guajacol ohne Einwirkung ist. Nach Issajew[1]) oxydiert die Phenolase des Malzes Hydrochinon und Pyrogollol, nicht aber Guajacol. Aso[2]) nimmt daher die Existenz einer spezifisch wirkenden „Guajacolase" an. Lehmann und Sano[3]) machen eine ähnliche Annahme. Wolff[4]) fand, daß Orcin durch Russulaextrakte energisch angegriffen wird, während die Phenolase des japanischen Lackbaumes („Lackase") darauf keine oxydierende Wirkung ausübt. Er nimmt daher an, daß Russulapilze eine spezifisch wirkende „Orcinase" enthalten. Rosell[5]), Kastle[6]) und Vernon[7]) schreiben die Oxydation des Röhmann-Spitzerschen Reagens der Wirkung einer spezifischen „Indophenolase" zu. Die von uns angestellten Versuche schienen daher nicht völlig aussichtslos zu sein.

Wie schon erwähnt, ist von Bach und Sbarsky festgestellt worden, daß zur vollen Lähmung der Phenolase bei der Oxydation des Hydrochinons bei weitem weniger Säure erforderlich ist, als bei der Oxydation des Pyrogallols und des Guajacols. Angenommen, daß jedem Substrat ein spezifisch wirkendes Ferment entspricht und daß diese spezifischen Fermente durch Säuren in ungleicher Weise beeinflußt werden, liegt die Möglichkeit vor, durch Einwirkung von Säuren die empfindlicheren Arten auszuschalten und zur Isolierung der weniger empfindlichen zu gelangen. Die Versuche wurden folgenderweise ausgeführt.

Wir stellten uns in üblicher Weise ein Phenolasepräparat dar und bestimmten die Säuremengen, die zum Aufheben der Fermentwirkung bei der Oxydation der drei genannten Substrate erforderlich waren. Wir lösten dann das Präparat (etwa 2 g) in Wasser und setzten etwas mehr Salzsäure zu, als zur völligen Lähmung der vermutlichen „Hydrochinonase" nötig war. Dabei wurden natürlich die erforderlichen Versuchsbedingungen — Konzentrationsverhältnisse, Temperatur, Einwirkungsdauer — streng

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 331, 1904.
[2]) Beiheft Bot. Zentralbl. **15**, 308, 1903.
[3]) Arch. f. Hygiene **67**, 99, 1908.
[4]) l. c. 77.
[5]) Über Nachw. u. Verbreit. intracell. Ferm. Straßburg 1901.
[6]) Bull. Hyg. Lab. Washington **1906**, Nr. 26.
[7]) Journ. of Physiol. **42**, 402, 1911.

eingehalten. Die saure Fermentlösung wurde mit dem 4 fachen Volumen starkem Alkohol versetzt, der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit 80%igem Alkohol bis zur Entfernung der Salzsäure gewaschen, mit absolutem Alkohol nachgewaschen und über Chlorcalcium getrocknet. Die Untersuchung des in dieser Weise behandelten Präparates ergab, daß es nicht nur Pyrogollol und Guajacol, sondern auch Hydrochinon oxydierte, und zwar etwa in den ursprünglichen Verhältnissen. Der Versuch wurde mit Schwefelsäure wiederholt, der Erfolg war aber der gleiche.

Es ist uns also nicht gelungen, durch energisch wirkende Säuren die vermutlichen spezifischen Phenolasen voneinander zu trennen, bzw. eine der Funktionen der Phenolase definitiv aufzuheben. Wir versuchten dann den erwünschten Zweck durch fraktioniertes Fällen mit Alkohol in Gegenwart von Magnesiumsulfat nach Bach[1]) zu erreichen. Auf die Versuche wollen wir hier nicht eingehen. Erwähnt sei nur, daß es in einigen Fällen gelingt, eine oder die andere der Oxydationsfunktionen der Phenolase abzuschwächen, nie aber völlig aufzuheben. So hatten wir Präparate in den Händen, die Guajacol ziemlich schwach oxydierten, aber auf Zusatz einer Spur Säure oder eines sauren Salzes ebenso energisch wie das ursprüngliche Präparat wirkten. Die Wirksamkeit der Fraktionen, die Hydrochinon nur schwach oxydierten, ließ sich durch Zusatz von Calciumacetat oder Manganacetat wieder herstellen. Wir erhielten bei diesen Versuchen den Eindruck, daß es sich bei der Fraktionierung nicht um eine Trennung spezifischer Phenolasen, sondern um eine Abscheidung von Bestandteilen handelt, durch die die Phenolasenwirkung in einem oder anderem Sinne beeinflußt wird. Für die Annahme der Existenz von artspezifischen Phenolasen fanden wir auch hier keine bestimmten Anhaltspunkte.

Unter diesen Verhältnissen erschien es uns als wünschenswert, die Ursachen der von einigen Forschern beobachteten Spezifitätserscheinungen bei der Phenolasewirkung zu ermitteln.

Die Bourquelotsche Beobachtung wurde zunächst nachgeprüft und bestätigt. Frischer Kartoffelsaft oxydiert energisch Hydrochinon und Pyrogollol, bleibt aber ohne Einwirkung auf Guajacol. Als wir aber zu einem farblos gebliebenen Gemisch von Kartoffelsaft und Guajacollösung etwas Hydroperoxyd gaben, erfolgte sofort intensive Rotbraunfärbung und Bildung von Tetraguajacochinon. Dieses Ergebnis war mit

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 362, 1911.

den jetzt geltenden Ansichten über die Phenolasewirkung anscheinend völlig unvereinbar. Die Tatsache, daß der Kartoffelsaft für sich allein Guajacol nicht oxydierte, wohl aber auf Zusatz von Hydroperoxyd, war dahin zu deuten, daß der Saft Peroxydase, aber keine Oxygenase enthielt. Andererseits mußte man aus der raschen Oxydation des Hydrochinons und des Pyrogallols auf die Anwesenheit von Oxygenase in ausreichender Menge schließen. Die der Phenolase entsprechende Oxygenase ist nicht spezifisch, da sie bei der Oxydation sämtlicher Substrate, darunter auch bei der des Guajacols, durch Peroxyde bzw. durch leicht oxydierbare, peroxydbildende Substanzen ersetzt werden kann. Dieser Widerspruch kann daher auf das etwaige Fehlen einer spezifischen, auf Guajacol eingestellten Oxygenase nicht zurückgeführt werden.

Bei näherer Untersuchung klärten sich die Verhältnisse ziemlich gut auf. Der Kartoffelsaft enthält nämlich neben Phenolase ein reduzierendes Ferment (Perhydridase) und reduzierende Substanzen. Neben den Oxydationsprozessen spielen sich im Safte auch Reduktionsprozesse ab. Je nach der geringeren oder größeren Reduzierbarkeit der Oxydationsprodukte erscheint der Oxydationsprozeß als gehemmt oder wird völlig verdeckt. Nun sind die Oxydationsprodukte des Guajacols, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht, bei weitem leichter reduzierbar, als die des Hydrochinons und des Pyrogallols

Äquivalente Mengen der drei Phenole wurden mit gleichen Phenolasemengen zusammengebracht und nach erfolgter Oxydation mit gleichen Mengen Kartoffelsaft versetzt. Nach kurzer Zeit entfärbte sich dabei die das Guajacol enthaltende Probe vollständig, während die zwei übrigen unverändert blieben. Das gleiche Resultat erhält man auch, wenn man den Kartoffelsaft durch frischen Leberauszug ersetzt. Gibt man den Kartoffelsaft oder den Leberauszug gleichzeitig mit der Phenolaselösung zu, so setzt die Oxydation des Guajacols beträchtlich später ein, als die des Hydrochinons oder des Pyrogallols.

Wenn also der Kartoffelsaft auf Guajacol ohne Einwirkung ist, so geschieht es nicht, weil es ihm an einer „Guajacolase" oder an einer auf Guajacol eingestellten Oxygenase fehlt, sondern weil in dem Saft der Oxydationsprozeß wegen der leichten Reduzierbarkeit der Oxydationsprodukte des Guajacols durch den Reduktionsprozeß verdeckt wird. Durch Zusatz von Hydroperoxyd oder überschüssiger Phenolase wird das Gleichgewicht zugunsten des Oxydationsprozesses verschoben und dann kommt auch die Oxydation des Guajacols zum Vorschein.

Die Ursache der Spezifitätserscheinungen, die Wolff zu der Annahme einer „Orcinase" Veranlassung gaben, ist eine ganz andere. Schon Wolff selbst bemerkt, daß die Oxydation des Orcins einen Alkalitätsgrad des Milieus verlangt, der etwa dem des Dinatriumphosphats entspricht. Dies ist also eine Vor-

bedingung der freiwilligen Oxydation des Orcins und daher auch conditio sine qua non der Phenolasewirkung auf Orcin. Bleibt die Oxydation des Orcins durch ein Phenolasepräparat aus, so hat man zunächst an das Fehlen dieser Vorbedingung der Grundreaktion zu denken und erst dann eine Artspezifität annehmen, wenn nach Erfüllen dieser Vorbedingung, d. h. nachdem dem Reaktionsgemisch die erforderliche Alkalität erteilt worden ist, die Phenolase noch unwirksam bleibt. Die Erfahrung spricht zugunsten der ersteren Voraussetzung.

Nach Wolff übt die „Lackase" aus dem japanischen Lackbaum auf Orcin keine oxydierende Wirkung aus, während es durch die Phenolase aus Russula delica rasch oxydiert wird. Leider stand uns kein Lackasepräparat zur Verfügung. Wir fanden aber, daß das der Lackase gleichwertige System Peroxydase (aus Meerrettich + Hydroperoxyd) auf Orcin ebenfalls ohne Einwirkung ist. Wir stellten daher vergleichende Oxydationsversuche mittels dieses Systems in An- und Abwesenheit von Dinatriumphosphat an. Dabei ergab sich, daß geringe Phosphatmengen, die für sich allein keine meßbare Beschleunigung der freiwilligen Oxydation des Orcins bewirkten, im Verein mit dem für sich allein ebenfalls unwirksamen System Peroxydase + Hydroperoxyd eine rasche Oxydation des Substrates hervorbrachten.

Zu der Annahme, daß die Oxydation des Orcins einer spezifisch wirkenden „Orcinase" zuzuschreiben sei, liegt also ebenfalls keine Veranlassung vor.

Weshalb die Oxydation des α-Naphthols und des Paraphenylendiamins auf die Wirkung einer von der gewöhnlichen Phenolase verschiedenen „Indophenolase" zurückgeführt wird, ist uns nicht klar. Es ist schon a priori wenig wahrscheinlich, daß die Phenolase, die beide Reagenzien getrennt oxydiert, auf diese, wenn vereinigt, ohne Einwirkung sei. Dementsprechend fanden wir, daß sämtliche von uns untersuchten Phenolasepräparate die Indophenolreaktion gaben, vorausgesetzt, daß die Versuchsbedingungen richtig gewählt werden. Ein weiterer Beweis der Identität der „Indophenolase" mit der gewöhnlichen Phenolase liegt darin, daß die Indophenolbildung durch das System Peroxydase + Hydroperoxyd mit größter Intensität hervorgebracht wird. Nun ist bisher kein einziger Fall bekannt, in dem dieses System sich irgendeinem Substrat gegenüber anders verhält, als die Phenolase. Man kann daher von der Indophenolreaktion der Phenolase, nicht aber von einer „Indophenolase" sprechen.

In einem vor kurzem erschienenen umfangreichen Aufsatz suchen Battelli und Stern[1]) bisher unbeachtete Spezifitätserscheinungen bei der Phenolasewirkung zum Ausdruck zu bringen. Von einer älteren Angabe Bertrands[2]) ausgehend, nach der die Lackase nur mehrwertige Phenole und Amine angreifen soll, belegen sie die Phenolase mit dem Namen „Polyphenoloxydase" und definieren letztere als ein Ferment, das die Oxydation „der Polyphenole und der entsprechenden Aminokörper" beschleunigen. Es ist schon von Bourquelot[3]) bewiesen worden, daß das jetzt als Phenolase bekannte Ferment sowohl Monophenole wie Polyphenole, Monoamine wie Polyamine oxydiert. Dazu bemerken aber Battelli und Stern, daß die von Bourquelot angewandten Fermentpräparate aus Pilzen stammten und Tyrosinase enthalten konnten. Es sei daher noch nicht bewiesen, daß die von ihm erzielten Oxydationen ausschließlich durch die Polyphenoloxydase bedingt waren.

Wir gaben uns die jetzt als fast überflüssig zu bezeichnende Mühe, die Beobachtungen Bourquelots mit den reinsten Phenolase- und Peroxydasepräparaten nachzuprüfen. Das von uns erhaltene Resultat ist vollkommen klar und eindeutig: die tyrosinasefreie Phenolase und das ihr gleichwertige System Peroxydase + Hydroperoxyd oxydieren Monophenole und Monoamine ebenso gut, wie Polyphenole und Polyamine. Die Bezeichnung „Polyphenoloxydase", die die Existenz einer „Monophenoloxydase" voraussetzt, ist daher belanglos.

Zusammenfassung.

1. Die Beeinflussung der Phenolasewirkung durch Salze (Calciumchlorid, Calciumacetat, Zinksulfat, Zinkacetat, Mangansulfat, Manganacetat, Aluminiumsulfat) bei der Oxydation verschiedener Substrate (Guajacol, Hydrochinon, Pyrogallol, Orcin, α-Naphthol + p-Phenylendiamin) hängt von der Natur des letzteren ab. Calciumchlorid wirkt z. B. hemmend auf die Oxydation des Guajacols und des Pyrogallols, fördernd auf die Oxydation

[1]) Ergebn. d. Physiol. **12**, 96 bis 268, 1912.
[2]) Compt. rend. **120**, 266, 1898.
[3]) Compt. rend. **123**, 375, 423, 1896.

der übrigen Substrate. Zinksulfat wirkt fördernd auf die Oxydation des Guajacols und des Röhmann-Spitzerschen Reagens, hemmend in den übrigen Fällen.

2. Zwischen der hydrolytischen Spaltbarkeit der Salze und ihrer Fähigkeit, die Phenolasewirkung zu beeinflussen, besteht kein direkter Zusammenhang. Die hydrolytische Spaltbarkeit der Salze ist daher nur einer der Faktoren der Beeinflussung.

3. Die freiwillige Oxydation der Substrate für sich (in Abwesenheit von Phenolase) wird durch Salze spezifisch beeinflußt.

4. Zu der Annahme, daß die bei der Phenolasewirkung auftretenden Spezifitätserscheinungen auf die Existenz spezifisch wirkender Phenolasearten zurückzuführen sei, liegt daher keine Veranlassung vor. Die beobachteten Spezifitäten sind als Eigenschaften der Substrate und nicht als Eigenschaften des Fermentes zu betrachten.

5. Die Spezifitätserscheinungen sind vermutlich dadurch bedingt, daß die Substrate mit den Salzen Komplexe bilden, deren Eigenschaften, darunter auch ihre Oxydationsfähigkeit, von denen der ursprünglichen Substrate verschieden sind.

6. Versuche, die behufs direkter Isolierung der in der Phenolase vermutlich enthaltenen spezifisch wirkenden Arten angestellt wurden, blieben erfolglos. Durch Behandeln der Phenolase mit Säuren unter Bedingungen, die zum völligen Aufheben ihrer Wirkung auf Hydrochinon erforderlich waren, und nachträgliches Ausfällen der sauren Fermentlösung mit Alkohol wurde ein Präparat erhalten, welches Hydrochinon wiederum oxydierte. Fraktioniertes Fällen mit Alkohol in Gegenwart von Magnesiumsulfat ergab ebenfalls ein negatives Resultat.

7. Die Nachprüfung einiger Angaben über die Existenz spezifisch wirkender Phenolasen ergab folgendes:

a) Das Ausbleiben der Oxydation des Guajacols durch frischen Kartoffelsaft ist nicht auf das Fehlen einer spezifisch wirkenden „Guajacolase", sondern auf die leichte Reduzierbarkeit der Oxydationsprodukte des Guajacols zurückzuführen. Neben Oxydationsprozessen spielen sich nämlich im Kartoffelsaft Reduktionsprozesse ab, durch welche die Oxydation des Guajacols, nicht aber die des Hydrochinons und des Pyrogallols verdeckt wird. Auf Zusatz von Hydroperoxyd oder

überschüssiger Phenolase wird das Gleichgewicht zugunsten des Oxydationsprozesses verschoben, wodurch die Oxydation des Guajacols sofort zum Vorschein kommt.

b) Das Ausbleiben der Oxydation des Orcins durch gewisse Phenolasepräparate, sowie durch das System Peroxydase + Hydroperoxyd ist nicht durch das Fehlen einer „Orcinase", sondern durch die Abwesenheit von alkalisch reagierenden Salzen (conditio sine qua non der freiwilligen Oxydation des Orcins) bedingt.

c) Die „Indophenolase" ist mit der gewöhnlichen Phenolase bzw. mit dem System Peroxydase + Hydroperoxyd identisch.

d) Zu der Annahme einer „Polyphenoloxydase", die nur Polyphenole und Polyamine oxydieren soll, liegt keine Veranlassung vor.

Zur Kenntnis der Eigenschaften des Phytins.

Vorläufige Mitteilung.

Von

M. A. Jegorow.

(Aus dem landwirtschaftlichen Institut in Petrowskoje-Rasumowskoje-Moskau.)

(Eingegangen am 1. Juni 1912.)

Es ist bekannt, daß W. Palladin[1]) in Petersburg der erste war, der 1894 das Phytin auffand. Die weitere Untersuchung dieser Verbindung hatte Palladin dann E. Schulze und E. Winterstein überlassen, die die analytische Zusammensetzung des Phytins feststellten. Im Jahre 1907 zeigte C. Neuberg[2]), daß die bis dahin als ein Formaldehydderivat aufgefaßte Verbindung in Wirklichkeit ein Inositphosphorsäureester ist. Den Darlegungen Neubergs, der auch ein Schema für die Konstitutionsformel angab, schloß sich dann E. Winterstein[3]) an. Damit war die Bedeutung des Phytins auf eine neue Grundlage gestellt. Seit dieser Zeit hat die Literatur dieser Frage einen großen Umfang erreicht, aber bis jetzt können wir trotzdem nicht sagen, daß alle Seiten dieser Frage klar und genau untersucht seien. Daß dem so ist, kann man schon durch die folgenden Zitate illustrieren: „... wird durch Molybdänlösung, Bleiacetat usw. ... Phytin gefällt", und auf der folgenden Seite: „Durch das Molybdänsäurereagens sind die Salze der Inositphosphorsäure nicht fällbar[4])." Das sind

---

[1]) W. Palladin, Zeitschr. f. Biol. **13**, 191, 1894.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **5**, 443, 1907; **9**, 557, 1908.

[3]) E. Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. **58**, 118, 1908.

[4]) V. Grafe, Biochem. Handlexikon **2**, 566 u. 567.

Zitate aus einer und derselben Übersicht von V. Grafe, der die verschiedenartigen Ergebnisse und Anschauungen möglichst vollständig aneinanderreiht.

In der letzten Zeit hat Starkenstein[1]) gezeigt, daß sich das Phytin schon unter dem Einflusse des Trocknens bei ca. 100° ungefähr zur Hälfte zersetzt, wobei der Autor unter Zersetzung des Phytins die Fällung seiner Phosphorsäure durch Molybdänlösung versteht. Hier kann man auch daran erinnern, daß schon ungefähr alle Autoren, die mit Phytin arbeiteten, bemerkt haben, daß das Phytin mit Ammoniummolybdat immer einen gelben Niederschlag gibt. Es ist sehr interessant hier zu bemerken, daß viele Autoren diese Erscheinung durch die Verunreinigungen des Phytins erklären. Starkenstein sagt auch, daß das Phytin mit anorganischen Phosphaten verunreinigt sei und daß durch das Trocknen ca. 57% der gesamten Phosphorsäure abgespalten werden. Um ein vollkommen reines Phytinpräparat darzustellen, hat Starkenstein das Ca-Salz der Inositphosphorsäure dargestellt und mit diesem Salz einige Versuche gemacht.

Endlich hat W. Vorbrodt[2]) gezeigt, daß das Phytin sich unter dem Einfluß von Wasser im Autoklaven bei 6 Atm. fast genau in Inosit und Phosphorsäure spaltet, und glaubt, mit seinen Versuchen nachgewiesen zu haben, daß Phytin nicht so beständig ist, wie man nach den Angaben von Winterstein hätte denken können; in dieser Arbeit Wintersteins ist freilich behauptet, daß Phytin widerstandsfähig ist gegenüber Alkalien, nicht aber gegenüber Wasser. Sonst ist die Arbeit von Vorbrodt auch noch dadurch wichtig, daß sie zeigt, zu welchen Resultaten man gelangen kann, wenn man nicht nur qualitativ (wie Winterstein), sondern auch quantitativ arbeitet; diese Arbeit Vorbrodts war die erste, in der wir quantitative Bestimmungen finden, wenn die Arbeit von Posternak[3]) nicht gerechnet wird, der die Spaltung des Phytins in seine Komponenten durch H_2SO_4 quantitativ untersucht hat.

Ich glaube, daß es richtiger ist von Phytinen als von

---

[1]) E. Starkenstein, diese Zeitschr. **30**, 56, 1910.

[2]) W. Vorbrodt, Untersuchungen über die Phosphorverbindungen in den Pflanzensamen usw. Krakau 1910.

[3]) Posternak, Compt. rend. **137**, 439, 1903.

Phytin zu sprechen. Schon E. Schulze und Ch. Godet[1]) haben gezeigt, daß das Verhältnis zwischen CaO und MgO in den Samen einerseits und in den Samenhüllen andererseits sehr bedeutende Verschiedenheiten aufweist. Und auch die Analysen haben gezeigt, daß in dieser Beziehung zwischen verschiedenen Präparaten des Phytins eine beträchtliche Mannigfaltigkeit herrscht. In der folgenden Tabelle werde ich einige Beispiele davon anführen:

	CaO	K_2O	MgO	P_2O_5	Analytiker
Das käufliche Phytin . .	13,42	—	8,05	22,30	Posternak[2])
„ „ „ . .	11,96	?	1,45	20,32	O. Horner[3])
„ Phytin aus Mais . . .	0,48	5,60	6,70	32,45	Hart[4])
„ „ Hafer . .	8,60	1,50	4,70	38,24	
„ „ Gerste . .	0,00	11,20	7,90	33,12	
„ „ Reiskleie .	5,18	—	17,48	23,48	Suzuki[5])

Diese Verschiedenheit in der chemischen Aschenzusammensetzung hat auch auf die chemischen Eigenschaften der Phytine einen Einfluß, wie man das aus folgenden von uns angestellten Versuchen ersehen kann. Wir arbeiteten mit 5 Präparaten des Phytins, und zwar: 1. dem käuflichen Präparat der Baseler Fabrik, 2. dem aus obengenanntem Präparat dargestellten sogenannten „gereinigten Phytin", oder Ca-Phytin von Starkenstein, 3. dem gleichfalls aus dem Baseler Präparat gewonnenen Mg-Phytin, 4. dem Phytin aus der Maiskleie und 5. aus Hanfsamen.

Alle diese Phytine sind ziemlich schwer in Wasser löslich, aber ganz leicht in schwachen Säuren. Gegenüber saurer Molybdänlösung zeigten diese Präparate folgende Verschiedenheiten:

1. Das käufliche Phytin gibt momentan den gelben Niederschlag, der sich unter dem Einfluß von Wärme noch vermehrt.

2. Das frisch bereitete Ca-Phytin gibt unter diesen Bedingungen keinen Niederschlag, aber nach 2 bis 3monatlichem Stehen gibt auch dieses Präparat einen schwachen gelben Niederschlag, der sich jedoch beim Erwärmen nicht vermehrt.

---

[1]) Schulze und Godet, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 156, 1908/09.
[2]) Posternak, Rev. gén. de Botan. 12, 5, 1909.
[3]) O. Horner, diese Zeitschr. 2, 428, 1907.
[4]) Hart, The Univ. of Wisconsin Agricult. Exp. St. Bull. No. 9, 1910.
[5]) Suzuki, The Bull. of the Coll. of Agr. Tokyo 7, Nr. 4, S. 495.

3. Das Mg-Phytin gibt anfangs einen sehr schwach gelb gefärbten Niederschlag, der bei längerem Stehen durch einen nunmehr sich reichlich abscheidenden weißen Niederschlag allmählich verdeckt wird.

Es ist merkwürdig, daß die ersten Erforscher des Phytins immer behaupteten, daß diese Verbindung mit der Molybdänlösung einen weißen Niederschlag gibt, obwohl in der letzten Zeit alle Forscher unter diesen Bedingungen nur den gelben Niederschlag erhielten. Vielleicht rührt dieser Unterschied von der Ungleichheit der Methoden zur Bereitung des Phytins bzw. von der verschiedenen chemischen Zusammensetzung der einzelnen Präparate her.

4. Unsere Mais- und Hanfphytine zeigten auch einige Unterschiede in bezug auf das Molybdänsäurereagens. Während das Maisphytin den gelben Niederschlag momentan gibt, entwickelt sich dieser beim Hanfphytin nur sehr allmählich.

Wir haben schon gesehen, daß Starkenstein behauptet, bei dem Trocknen des Phytins ungefähr die Hälfte von dessen Phosphorsäure als anorganische abgespalten zu haben. Diese Tatsache ist sehr interessant und ihre Bedeutung wäre noch größer, wenn die erhebliche Unbeständigkeit des Phytins dadurch nachgewiesen wäre. Aber jene Angabe Starkensteins beruht nur auf der Beobachtung, daß das saure molybdänsaure Ammonium ca. 57% Phosphorsäure ausfällt. Es ist nun aber bekannt, daß die anorganische Phosphorsäure viele Reaktionen mit verschiedenen Reagenzien gibt. Ich glaube demnach, wenn Starkenstein beim Trocknen wirklich anorganische Phosphorsäure erhalten hat, dann sollten wir diese Reaktion nicht nur mit dem sauren Ammoniummolybdat, sondern auch z. B. mit Magnesiamixtur in Ammoniumcitratlösung erhalten. Aber alle unsere dahinzielenden Versuche hatten immer nur negative Resultate.

In Übereinstimmung mit Starkenstein habe ich schon vor einigen Jahren gefunden, daß vom Phytin immer ca. 20% seiner P_2O_5 mit der Molybdänlösung ausgefällt wird. Unsere im folgenden angeführten Versuche haben das Ziel, zu zeigen, daß das Trocknen des Phytins eine sehr komplizierte Erscheinung ist und daß es durchaus nicht immer so einfach zu erklären ist, wie Starkenstein vermutet.

Wir haben zwei Proben des käuflichen Phytins genommen und eine Probe bei 100°, die zweite im Vakuum über konz. H_2SO_4 getrocknet. Die erste Probe hat in 9 Stunden 7,045% ihres Gewichts, die zweite in 6 Tagen 6,668% verloren. Im ersten Falle haben wir 30,90%, im zweiten 29,25% der gesamten Phosphorsäure zunächst als Niederschlag von Ammoniummolybdat erhalten und hierauf als $Mg_2P_2O_7$ gewogen. Der parallele Versuch mit dem ungetrockneten Phytin gab bei Anwendung derselben Methode nur 17,14% der gesamten P_2O_5 in dem Niederschlag.

Diese Versuche zeigen also, daß die Temperatur beim Trocknen hierbei keine Rolle spielt.

Weiter wollten wir den Einfluß der Luft (richtiger des Sauerstoffs) auf das Phytin beim Trocknen untersuchen. Wir haben einige Proben des Phytins im Wasserstoff- und Kohlensäurestrom bei 100° getrocknet; dabei bemerkten wir, daß das Trocknen hier sehr viel rascher vor sich geht als im Luftschranke. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der betreffenden Resultate:

	Nach Trocknung		Ohne Trocknung
	im H-Strom	im CO_2-Strom	
Gewicht des Phytins	0,3392 g	0,3940 g	0,2976 g
Gewichtsverlust nach 1¼ St.	0,0294 g	0,0364 g	—
„ „ einer weiteren ¼ St.	0,0014 g	—	—
„ „ „ „ ¾ „	—	0,0014 g	—
Trockensubstanzverlust in %	9,08	9,594	—
P_2O_5 in % der Gesamt-P_2O_5	21,81	20,03	15,75

Daraus ergeben sich nun drei Folgerungen:

1. Man kann das Trocknen des Phytins im Strome eines indifferenten Gases leichter erreichen als an der Luft.

2. Die Menge der durch Molybdänlösung ausgefällten Phosphorsäure ist beim Trocknen zwar größer als ohne diese, doch ist der Unterschied kein bedeutender.

3. Der Gesamtverlust der Trockensubstanz ist beim Trocknen in indifferenten Gasen etwas höher als beim Trocknen an der Luft.

Diese Versuche deuten also darauf hin, daß das Phytin sehr leicht oxydierbar ist. Darauf weisen auch unsere Ver-

suche mit dem Einfluß des Wasserstoffsuperoxyds auf Phytin unter folgenden Bedingungen hin: Phytin wurde mit 10% H_2O_2 übergossen und 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann abfiltriert und mit der Molybdänlösung geprüft. Die Bestimmung der Phosphorsäure als $Mg_2P_2O_7$ ergab die folgenden Resultate:

Beim Stehen mit destilliertem Wasser haben wir 15,80% der gesamten P_2O_5 ausgefällt, mit H_2O_2 in einem Falle 33,54%, und in einem anderen 46,80% der gesamten P_2O_5. Es ist sehr interessant, hier festzustellen, daß dabei Magnesiamixtur nach der Methode von Schulze und Castoro keinen Niederschlag gab. Ganz klar und selbstverständlich ist auch, daß wir gar keine Spuren des Inosits unter diesen Bedingungen erhalten konnten.

Es ist wichtig, hier vorläufig zu bemerken, daß man das käufliche Phytin in 3 Fraktionen trennen kann, deren jede ganz verschiedene Eigenschaften zeigt. Zu diesem Zwecke habe ich das käufliche Präparat dialysiert und dabei 3 Fraktionen erhalten: 1. den unlöslichen Teil im Dialysator, 2. die Flüssigkeit im Dialysator und 3. die Flüssigkeit außerhalb des Dialysators. Alle diese Teile haben folgende Beziehungen zur sauren Molybdänlösung gezeigt: Die erste und zweite Fraktion gaben dabei nach 5stündigem Stehen keinen Niederschlag und fällen nur über Nacht einen kaum merkbaren gelben Niederschlag aus. Die dritte Fraktion gab dagegen momentan beträchtliche Mengen des gelben Niederschlags. Die analytische Bestimmung hat gezeigt, daß die erste Fraktion 34,00% (34,14 bis 33,86) P_2O_5, auf lufttrockene Substanz berechnet, enthielt. Der in der zweiten Fraktion durch Alkohol bewirkte Niederschlag enthält 42,30% (40,31 bis 43,90) P_2O_5, auf lufttrockene Substanz bezogen.

Wenn man also bis jetzt auch nicht ganz bestimmt sagen kann, ob das käufliche Phytin anorganische Phosphorsäure enthält, oder nicht, so kann man doch ganz bestimmt behaupten, daß man mit der Molybdänlösung die anorganische P_2O_5 von der P_2O_5 des Phytins nicht abzutrennen vermag, und ferner, daß allen Arbeiten, die anorganische P_2O_5 nach dieser Methode bestimmt haben, nur sehr begrenzte Bedeutung zukommt, besonders dann, wenn selbst nach dieser Methode nur geringe Mengen P_2O_5 erhalten wurden.

Z. B. können wir hier die Arbeit U. Suzuki, K. Yoshimura

und M. Takaishi[1]) über „Phytase" anführen. Bekanntlich haben diese Autoren einen weißen Niederschlag aus der Reiskleie erhalten, in dem sie das Ferment „Phytase" annahmen. Nach 2tägiger Versuchsdauer konnten diese Autoren nach der Molybdänmethode im Niederschlage nur ca. 10% der gesamten P_2O_5 des Phytins erhalten und sie haben dieses Resultat mit folgenden Worten charakterisiert:

„0,5 g Phytin wurde in 50 ccm H_2O gelöst, 0,02 g dieses Phytasepräparates zugegeben und bei einer Temperatur von 35 bis 40° stehen gelassen. Nach 4 Stunden konnte man schon die Abspaltung von Phosphorsäure durch Molybdänlösung nachweisen und nach 2 Tagen waren etwa 10% des angewandten Phytins gespalten."

Ich glaube, daß die japanischen Autoren keinen zureichenden Grund zu dieser Behauptung haben, weil man bei diesen Bedingungen ohne „Phytase" ganz gleiche Resultate erhalten kann.

Weiter kann man auch sagen, daß wir bis jetzt keine genaue Methode zu dieser Trennung der anorganischen von der organischen P_2O_5 haben. In einigen Fällen gibt die Methode von Schulze und Castoro sehr gute Resultate. So z. B. haben wir einen Versuch mit der Abtrennung der P_2O_5 des NaH_2PO_4 von der Phytin-P_2O_5 nach dieser Methode gemacht und sehr gute Resultate erhalten: es wurde 0,0354 g P_2O_5 als NaH_2PO_4 und 0,0977 g P_2O_5 als Phytin genommen und nach der Methode von Schulze und Castoro in einem Fall 0,0371 g und in einem anderen 0,0367 g P_2O_5 erhalten.

Auf Grund unserer Resultate können wir behaupten, daß das Phytin eine sehr veränderliche Verbindung ist und daß es sehr wenig widerstandsfähig ist.

Das gab uns die Möglichkeit, unsere Versuche etwas weiter zu führen, und in erster Linie wollten wir das Verhalten des Phytins beim Kochen mit destilliertem Wasser bei gewöhnlichem Druck untersuchen. Schon der erste Versuch gab uns sehr merkwürdige Resultate:

Wir nahmen 1,9484 g Phytin, übergossen es mit 50 ccm Wasser, kochten es durch 16 Stunden auf freier Flamme am Rückflußkühler. Hierbei ergab sich zunächst Braunfärbung der Flüssigkeit. Die Bestimmung der Phosphorsäure nach Schulze

[1]) The Bull. of the Coll. of Agr. 7, Nr. 4, S. 503.

und Castoro zeigte, daß 22,14 % der gesamten P_2O_5 in den Niederschlag übergeht (Phytin enthält 22,3 % P_2O_5).

Mit dieser Feststellung der Tatsache, daß das Phytin leicht „verseifbar" ist, war also die erste Hälfte der Frage beantwortet.

Weiter wollten wir noch zeigen, daß man bei diesen Bedingungen auch Inosit erhalten kann.

Zu diesem Zwecke haben wir ca. 10 g Phytin genommen und 14 Stunden lang im Baboblech ebenfalls am Rückflußkühler gekocht, dann abfiltriert und in einem Teile des Filtrats anorganische P_2O_5 nach obiger Methode bestimmt. Dabei konnte ich auch konstatieren, daß ungefähr die ganze P_2O_5 abgespalten wurde. Der größte Teil des Filtrates wurde mit umkrystallisiertem Baryt gefällt, auf der Nutsche abgesaugt und auf dem Wasserbade bis zur Trockne abgedampft. Der trockene Rückstand wurde mit 80 % Alkohol ausgelaugt, nochmals abfiltriert, auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Äther bis zur Trübung versetzt. Beim Stehen im Vakuum über konzentrierter H_2SO_4 schieden sich allmählich die für Inosit charakteristischen Krystalle aus. Diese Krystalle gaben die Reaktion von Scheerer sehr deutlich und zeigten den Schmelzunkt 219°. Die Ausbeute betrug ca. 0,5 g.

Es war auch wichtig, die Versuche von Winterstein unter gewöhnlichem Druck zu wiederholen. Ich habe eine Quantität des Phytins mit 20 % NaOH übergossen und 22 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure nach Schulze und Castoro hatte ein ganz negatives Resultat; die Behauptung Wintersteins für diese Versuchsanordnung besteht also zu Recht.

Es ist bemerkenswert, daß wir bei allen unseren Versuchen beim Trocknen des Phytins immer eine beträchtliche Vergrößerung der Acidität beobachten konnten.

Die Versuche werden noch fortgesetzt.

Über den Durchtritt von Salzen durch das Protoplasma.

I. Mitteilung.

Über die Beeinflussung der Farbstoffaufnahme in die lebende Zelle durch Salze.

Von

Josef Endler.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der deutschen Universität Prag.)

(Eingegangen am 4. Juni 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Einleitung und Methoden.

Diese Untersuchungen streben eine Erweiterung der Kenntnis jener Vorgänge an, die mit dem Eindringen von Neutralsalzen in die lebende Zelle verknüpft sind. Vor allem sollte studiert werden, welchen Einfluß hierbei ein verschiedener Gehalt von OH- und H-Ionen der Außenlösung hat und welche Bedeutung Temperaturänderungen zukommt. Die vorliegende Mitteilung enthält Untersuchungen über die Beeinflussung der Aufnahme von Farbstoffen durch gleichzeitig gelöste Salze. Nach dem gegenwärtigem Zustand der Methodik ist jedoch eine einwandfreie Bestimmung der Menge eines in die Zelle eingedrungenen Stoffes nicht durchführbar und es mußte ein indirekter Weg gesucht werden, der wenigstens zu vergleichbaren Resultaten führen konnte. Es ist nun durch die Untersuchungen von Morton Masius[1]) und Schmidt[2]) bekannt, daß allgemein in Gemischen zweier Stoffe die von einer Oberfläche adsorbierte Menge des einen um so mehr abnimmt, je stärker der zweite adsorbiert wird. Diese Adsorption hängt

[1]) Morton Masius. Diss. Leipzig 1908.

[2]) G. C. Schmidt, Zeitschr. f. physikal. Chem. 74.

einerseits von der vorhandenen Menge des betreffenden Stoffes, andererseits von einer von der Natur des Stoffes und der untersuchten Oberfläche abhängigen Konstanten ab. Kennt man nun die Konzentration der beiden in der Lösung vorhandenen Stoffe und läßt sich wenigstens die adsorbierte Menge des einen feststellen, so lassen sich, wie im folgenden gezeigt wird, aus dieser Bestimmung mit einiger Wahrscheinlichkeit Schlüsse auf die Adsorption des zweiten Stoffes ziehen.

Die in die Zelle aufgenommene Menge eines Farbstoffes läßt sich auf mikroskopischem Wege schätzen und dadurch mit relativer Genauigkeit bestimmen. Es wurden daher den zu untersuchenden Salzlösungen Anilinfarbstoffe zugesetzt und beobachtet, wie sich die in die lebende Zelle eindringende Menge derselben unter verschiedenen Bedingungen verändert. Es war von vornherein zu erwarten, daß eine erhöhte Adsorption des Mineralsalzes von einer Verminderung der aufgenommenen Farbstoffmenge begleitet sein mußte. Allerdings ermöglicht die mikroskopische Kontrolle keine absoluten Feststellungen, es können jedoch die vorliegenden Beziehungen als qualitativ sichergestellt betrachtet werden. Der Unsicherheit der subjektiven Methode, die durch die nicht auszuschließende Variabilität des Materials noch erhöht wird, wurde durch öftere Wiederholung der besprochenen Versuche und durch die Wahl möglichst zahlreicher, eng aneinanderliegender Konzentrationen des zu prüfenden Stoffes nach Tunlichkeit entgegengetreten.

Aus dem Charakter der Farbstofflösungen ergeben sich zunächst Anhaltspunkte, inwieweit Beziehungen, die sich aus den Änderungen der durch den Protoplasten tretenden Farbstoffmenge unter dem Einflusse eines Neutralsalzes ableiten lassen, auch allgemein auf zwei Neutralsalze übertragbar sind. Dies wird im allgemeinen dann möglich sein, wenn ein Farbstoff in Wasser wenigstens in hochverdünntem Zustande echte Lösungen bildet. In diesem Falle verhält er sich in bezug auf Dialyse durch Membranen und Adsorption den Neutralsalzen analog und man kann die für sein Eindringen in die Zelle ermittelten Beziehungen mit gewissen Kautelen allerdings als auch für Neutralsalze geltend ansehen. Wird demnach ein solcher Farbstoff zu diesen Versuchen gewählt, so gibt das Ergebnis einen Überblick über das Verhalten binärer Salzlösungen beim Eindringen in die Zelle. Je mehr jedoch der Dispersitätsgrad des Farbstoffes abnimmt, desto mehr treten typische Kolloideigenschaften auf, wie leichte Fällbarkeit durch Salzlösungen und Abnehmen der Dialysiergeschwindigkeit. Die Aufnahme eines solchen Farbstoffes in das Protoplasma wird in der Regel unter jenen Erschei-

nungen vor sich gehen, die man als Ausfällung entgegengesetzt geladener Kolloide zusammenfaßt. Auch in diesem Falle wird eine Beeinflussung der gespeicherten Farbstoffmenge durch gleichzeitig vorhandene Neutralsalze möglich sein, doch dürften die gegenseitigen Beziehungen andere sein, als bei echtlöslichen Farbstoffen. Die Daten über die Lösungsverhältnisse der Farbstoffe sind zu entnehmen aus der Capillarchemie von Freundlich. Auch Ruhland[1]) hat in einer Studie eine Zusammenstellung der diesbezüglichen Ergebnisse gegeben.

Für die vorliegende Untersuchung wurden nur echtlösliche Farbstoffe herangezogen. Der größte Teil der Versuche wurde mit Methylenblau gemacht (rotstichiges Präparat von Merck), doch wurden sie in der Regel auch mit Neutralrot durchgeführt, um Vergleichsmaterial zu haben. Methylenblau ist ultramikroskopisch klar und wird weder vom lebenden noch vom toten Protoplasten in nennenswertem Grade gespeichert. Es ist demnach in seinen Lösungsverhältnissen vollständig analog den Neutralsalzen und wird wie diese nur in geringem Maße adsorbiert. Neutralrot zeigt bereits etwas kolloidalen Charakter. Ultramikroskopisch sind wenige Submikronen sichtbar. Durch Salze läßt es sich bei genügender Konzentration ausfällen und es sei diesbezüglich daran erinnert, daß es bereits in Seewasser (ca. $^1/_2$ n-Kochsalz) bedeutend schwerer löslich ist als in destilliertem Wasser. Durch Alkalien wird die gelbgefärbte Base des Neutralrotes in Freiheit gesetzt. Diese ist typisch kolloidal und nur im geringen Maße in Wasser löslich. Sie wird durch Salze leicht und völlig aus der Lösung niedergeschlagen.

Methylenblau und Neutralrot werden in der Zelle durch Bindung an Körper schwachsauerer Konstitution, die man als Gerbstoff im weitesten Sinne des Wortes bezeichnen mag, niedergeschlagen. Die dadurch entstehenden Tannate sind in Wasser schwer löslich. Stellt man sie durch Vermischung äquivalenter Mengen von Farbstoff und Gerbsäure her, so ist die dadurch entstehende Lösung, wenn kein Überschuß an Gerbsäure vorhanden ist, nur dann vollständig beständig, wenn sie absolut salzfrei ist und zu ihrer Darstellung doppelt destilliertes Wasser genommen wurde. Sogar der Salzgehalt des gewöhnlichen destillierten Wassers genügt, um sie in einigen Tagen auszuflocken. Das Farbstofftannat zeigt sich demnach als typisch suspensoides Kolloid. Die Bildung des Tannats ist von einer Herabsetzung des Dispersitätsgrades des Farbstoffes begleitet. Charakteristisch ist diesbezüglich, daß das Neutralrottannat rotviolett gefärbt ist. Ist jedoch ein Überschuß an Gerbstoff vorhanden, so ist das Tannat Salzen gegenüber viel beständiger. In der Zelle beobachtet man demnach auch, solange noch überschüssiger Gerbstoff vorhanden ist, zuerst nur eine diffuse Färbung des Zellsaftes, beim Eindringen weiterer Farbstoffmengen treten dann Tannatniederschläge auf, bis schließlich der Gerbstoff quantitativ ausgefällt ist.

In den Plasmakolloiden wird Methylenblau kaum in sichtbarer Menge gespeichert, dagegen kann man bei Neutralrot manchmal eine

[1]) Ruhland, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26, 772, 1908.

Färbung des Protoplasten beobachten. Im Zellsaft können, wie bereits Pfeffer[1]) bemerkte und wie durch einige hier mitzuteilende Beobachtungen ziemlich wahrscheinlich gemacht wird, auch gelöste Eiweißkörper den Farbstoff zurückhalten. Starkes Auftreten vitaler Plasmafärbung kann in der Regel als ein Kennzeichen kolloidgelöster Farbstoffe betrachtet werden.

Außerdem ist es möglich, daß Farbstoffe sich in Fetttröpfchen lösen, die im Protoplasma eingebettet sind. Um auch diese Art der Speicherung studieren zu können, wurde indigsulfosaueres Na (gepulvertes Präparat des Prager Chemikalienhandels), dann Alkanna und Sudan III (Merck-Darmstadt) verwendet. Außerdem wurde zur Lösung von Spezialfragen eine Reihe sauerer Farbstoffe, sämtlich von Merck, herangezogen.

Als fetthaltiges Material wurden die Kotyledonen verschiedener fetthaltiger Samen (gekeimt wie ungekeimt), so Ricinus, Lupinus albus, Helianthus benutzt. Im übrigen wurde durchwegs mit Wasserpflanzen sowohl marinen Ursprungs wie mit Süßwasserformen gearbeitet. Die Meeresalgen stammten durchwegs aus der zoologischen Station in Triest. Möglichste Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse bei dünner Zellwand, um den Farbstoffen usw. den Eintritt ins Innere der Zellen nicht zu verwehren, Gleichmäßigkeit und möglichst leicht anzustellende mikroskopische Untersuchung waren die Anforderungen, die an das Material gestellt wurden.

Von Meeresalgen bewährte sich besonders Ulva lactuca und Nitophyllum punctatum. Ulva lactuca ist eine Brackwasseralge und kann demnach bedeutende Schwankungen der Salzkonzentration ertragen, ohne irgend Schaden zu nehmen. Bei Nitophyllum ist der Zwischenraum zwischen den beiden Grenzkonzentrationen bedeutend geringer. Ulva lactuca kam in Stücken von etwa $1\frac{1}{2}$ bis 2 ccm Fläche in Verwendung, von Nitophyllum wurden möglichst gleiche Thallusstücke aus dem Material herausgesucht.

Elodea densa und verschiedene Arten von Spirogyren waren die gewöhnlich gebrauchten Süßwasserpflanzen. Bei beiden vermindert sich die gespeicherte Farbstoffmenge im Winter. Die Zellen des Elodeablattes sind nicht gleichmäßig imstande Farbstoff aufzunehmen. Am stärksten speichern die Zellen des reduzierten Leitbündels und die Zellen an der Spitze und der Basis des Blattes. Außerdem sind über die Fläche des Blattes längliche, sehr gerbstoffreiche Zellen, Gerbstoffidioblasten, verteilt, die große Mengen Farbstoff an sich reißen. Es ist demnach notwendig, bei vergleichender Kontrolle der Versuche ganz besonders darauf zu achten, daß nur gleich gelegene Partien des Blattes zur Beurteilung gelangen.

---

[1]) Pfeffer, Untersuchungen aus dem bot. Institut in Tübingen, 2, 181.

Bemerkungen zur Literatur.

Daß Neutralsalze die Aufnahme von Farbstoffen in die Zelle hemmen, war bereits Pfeffer[1]) bekannt. Für lebende Zellen ist dies dann von Hugh. C. Roß[2]) und Szücs[3]) eingehend studiert worden. Im allgemeinen läßt sich diese Erscheinung, wie bereits erörtert wurde, als eine Verdrängung des Farbions von der Plasmaoberfläche auffassen und sie kann demnach sowohl an der lebenden wie an der toten Plasmaoberfläche analog beobachtet werden. An toten Infusorienzellen ist sie von Brailsford Robertson[4]) studiert worden, und er fand, daß die einzelnen Salze nach der Stärke der Verdrängung des Farbstoffes sich in der Reihenfolge anordnen, die auch sonst für die Adsorption und die fällende Kraft beobachtet wurde.

Bei lebenden Zellen kommen noch die charakteristischen Strukturverhältnisse des lebenden Protoplasmas in Betracht und man wird infolge des Ineinandergreifens der Wirksamkeit verschiedener adsorbierender Oberflächen kompliziertere Verhältnisse erwarten müssen. Außerdem haben wir es im Protoplasma mit äußerst labilen Eiweißkörpern zu tun, und es ist demnach bei der Deutung von Permeabilitätsänderungen für den Farbstoff auch die Möglichkeit von Zustandsänderungen des Plasmas nicht außer acht zu lassen. Es ist also nach dem derzeitigen Zustande der diesbezüglichen Kenntnisse nicht möglich, die beobachteten Beziehungen bis ins Detail zu analysieren.

Während Pfeffer in seinen Untersuchungen nur die Tatsache als solche feststellte, daß einerseits konzentrierte Salzlösungen die Aufnahme von Farbstoffen in die Zelle hemmen, andererseits den Austritt von Farbstoff beschleunigen können, bemühten sich Roß[5]) und Szücs[6]), die hier vorliegenden Tat-

---

[1]) Pfeffer, Untersuchungen aus dem bot. Institut in Tübingen, II, 181.

[2]) Hugh. C. Roß, Proc. Roy. Soc. **81**.

[3]) Szücs, Sitzungsber. d. Wien. Akad. **119**, 1. Jul 1910.

[4]) Brailsford Robertson, Journ. of Biol. Chem. **4**, 1, 1908.

[5]) Roß, l. c.

[6]) Szücs, l. c.

sachen quantitativ zu fassen. Roß studierte die Farbstoffaufnahme in Erythrocyten und fand, daß diese durch Neutralsalze gehemmt, durch Alkali dagegen in niederer Konzentration gefördert wird. Er suchte seine Beobachtungen zu einer Ermittlung des Diffusionskoeffizienten des lebenden Protoplasmas derart auszunützen, daß er die Konzentrationen der hemmenden bzw. fördernden Stoffe in Einheiten darstellte, die er je nach dem Sinne der Beeinflussung positiv oder negativ nahm, indem er von der Annahme ausging, daß es sich hier im wesentlichen um additive Beziehungen handelt.

Wichtiger sind die Untersuchungen von Szücs. Dieser erhielt seine Resultate durch Feststellung der Zeit, die erforderlich ist, damit der Farbstoff in einer gewissen, beliebig angenommenen Menge in der Zelle gespeichert wird. Der größte Teil seiner Versuche wurde mit dem hochkolloidalen Methylviolett durchgeführt. Auf diese Weise fand er für ein wegen der Giftigkeit der Farbstoffe ziemlich enges Konzentrationsgebiet, daß die Geschwindigkeit der Farbstoffaufnahme der Konzentration des Farbstoffes proportional ist und sie demnach von der Fickschen Diffusionsgleichung mit großer Annäherung wiedergegeben werden kann. Er stellte auch die hemmende Wirkung von Neutralsalzen und die fördernde Wirkung von Alkali fest. Er konnte nachweisen, daß das Verhältnis der Abhängigkeit zwischen der Konzentration des anwesenden Neutralsalzes und der Zeit, die zur Speicherung des Farbstoffes notwendig ist, mit ziemlicher Genauigkeit durch die Ostwaldsche Adsorptionsisotherme dargestellt wird.

Diese Untersuchungen, die, wie ausdrücklich hervorgehoben sein mag, gleichzeitig und unabhängig von den Versuchen von Szücs angestellt wurden, haben Ergebnisse geliefert, die von den Resultaten dieses Autors abweichen, wie vorgreifend bemerkt werden soll. Es hat sich gezeigt, daß steigende Konzentration von Neutralsalzen bis zu einem bestimmten Gehalt der Außenlösung die aufgenommene Farbstoffmenge vergrößert, und daß erst bei weiterer Vermehrung des Elektrolytgehaltes die Farbstoffaufnahme gehemmt wird. Dieser Unterschied dürfte entweder in der Wahl des Farbstoffes, bei Szücs Methylviolett, oder auch in der Methodik, hier Beobachtung eines sich einstellenden Gleichgewichtszustandes, dort Bestimmung der Zeit

für die Speicherung einer bestimmten Farbstoffmenge begründet sein. Auch Verschiedenheiten des Untersuchungsmaterials können von Bedeutung sein.

II. Versuche bei konstanter Temperatur.

1. Verhalten von Neutralsalzen bei der Aufnahme des Farbstoffes in die Zelle.

Die ersten Versuche, die angestellt wurden, um die Beziehungen zwischen Salzen und Farbstoffen kennen zu lernen, wurden mit Meeresalgen angestellt. Es wurde dazu Adriawasser benutzt, das eine natürliche physiologisch balancierte Lösung darstellt und so gestattet, eventuelle Spezialwirkungen von Ionen auf das Protoplasma auszuschließen. Zur Verdünnung wurde Leitungswasser benutzt.

Zu dem Versuche wurden je 150 ccm Meerwasser, das durch steigende Mengen von Flußwasser verdünnt wurde, verwendet. An Farbstoff wurde zugesetzt $^1/_{5000}$% Neutralrot, als Material diente Ulva lactuca.

1. Kontrolle nach 12 Stunden.

150 ccm	Seewasser:		Im Gesichtsfelde viele stark gefärbte Zellen.
140 „	„	+ 10 ccm	Flußwasser: Intensiv gefärbte Zellen nehmen an Zahl und Intensität ab.
130 „	„	+ 20 „	„ : Viele schwach gefärbte Zellen.
120 „	„	+ 30 „	„ : Färbung nimmt weiter ab.
110 „	„	+ 40 „	„ : Zahl der schwach gefärbten Zellen nimmt stark ab.
100 „	„	+ 50 „	„ : Nur hin und wieder eine schwach gefärbte Zelle.

Der Ulvathallus ist in allen Teilen des Versuches gleichmäßig frisch und turgeszent.

2. Kontrolle am 4. Tage des Versuches.

Das Schwächerwerden der Färbung nach unten ist noch deutlich sichtbar, in den niederen Konzentrationen sind aber bedeutende Zeichen von Schädigung zu bemerken, was an auftretender Plasmafärbung kenntlich ist.

Dieser Versuch zeigt demnach, daß die Salzkonzentration, bei der die Zellen von Ulva lactuca die größte Menge des Farbstoffes aufnehmen, der des natürlichen Meerwassers entspricht. Eine Verdünnung des Seewassers um ein Drittel bedingt bereits, daß die Speicherung des Farbstoffes in den meisten

Zellen nicht mehr erfolgt. Die Zellen nehmen so lange Farbstoff auf, bis die in der Zelle vorhandene Farbstoffmenge einen für die betreffende Farbstoff- und Salzkonzentration charakteristischen Wert erlangt hat. Demgemäß sind auch bei der Kontrolle am 4. Tage die Abstufungen in der Färbungsintensität noch deutlich zu sehen.

Um nun auch das Verhalten einer Pflanze kennen zu lernen, die an eine niedrige Salzkonzentration angepaßt ist, sei ein Versuch mit Elodea berichtet. Die Konzentration der Außenlösung wurde in diesem Falle durch Hinzufügung von NaCl gesteigert. Dabei kam auch der Einfluß zur Untersuchung, den ein verschiedener Gehalt der Lösung auf das Endresultat der Speicherung hat.

2. Der Versuch wurde angestellt in Einsiedegläsern mit Elodea. Verwendet wurde Leitungswasser mit Zusatz von 0,1 bis 0,6 Mol NaCl in Stufen von 0,1 Mol.

1. Kontrolle nach 24 Stunden.

Serie a.

$^1/_{10000}$% Neutralrot.

Der Gang der Färbungsintensität ist ungefähr derselbe wie in $^1/_{2000}$%. Es ist jedoch schwer zu entscheiden, ob die größte Farbstoffmenge bei 0,2 oder 0,3 Mol gespeichert wird. Die Intensität der Speicherung bleibt jedoch hinter der Parallelserie zurück.

Serie b.

0 Mol NaCl: Färbung der Idioblasten; Niederschläge in den Zellen.
0,1 „ „ : Beginn der Plasmolyse, Färbung gewachsen.
0,2 „ „ : Starke Plasmolyse, Färbung gewachsen.
0,3 „ „ : Maximum der Färbung.
0,4 „ „ : Gespeicherte Farbstoffmenge wird bedeutend geringer, es sind hauptsächlich die Zellen des Leitbündels und die Gerbstoffidioblasten gefärbt.
0,5 „ „ : Die meisten Zellen bereits ungefärbt.
0,6 „ „ : Nur die Idioblasten sind noch gefärbt.

2. Kontrolle nach 48 Stunden.

Färbungszustand im wesentlichen erhalten. Bei Serie b scheint das Optimum bei 0,2 Mol zu liegen.

Dieser Versuch ergänzt den vorhergehenden, insofern aus ihm erhellt, daß die aufgenommene Farbstoffmenge mit der Konzentration des Salzes nur bis zu einem bestimmten Punkte ansteigt, um bei weiterer Steigerung des Salzgehaltes wiederum abzunehmen. Bei der niedrigen Farbstoffkonzentration liegt

dieses Optimum bei 0,2 oder 0,3, bei der höheren ist es sicher 0,3. Wenn man versucht, auf Grund dieser Resultate die Bedeutung der vorhandenen Farbstoffmenge zu erfassen, wird man diesem Umstande wenig Bedeutung beimessen dürfen, da die Bestimmung der Optimalkonzentration infolge der subjektiven Beobachtungsmethode immer mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist. Wichtig ist jedoch, daß das Ansteigen und das darauffolgende Sinken der in die Zellen aufgenommenen Farbstoffmenge weitgehend unabhängig ist von dem Gehalte der Außenlösung an Farbstoff. In konzentrierteren Lösungen des Farbstoffes wird wohl mehr Farbstoff aufgenommen, und die Zellen sind dementsprechend stärker gefärbt, das Verhältnis der Farbstoffmengen aber, die bei einem verschiedenen Elektrolytgehalte der Außenlösung in die Zelle eintreten, bleibt jedoch annähernd das gleiche wie in den verdünnteren. Die schließlich in die Zelle aufgenommene Menge des Farbstoffes ist annähernd proportional dem Farbstoffgehalt der Außenlösung, steht aber in ziemlich verschränktem Verhältnis zur Konzentration der übrigen vorhandenen Elektrolyte.

Um nun die Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Salz studieren zu können, schien es zunächst notwendig, Spezialwirkungen einzelner Ionen nach Tunlichkeit auszuschließen. Dabei mußte jedoch die Zusammensetzung der Außenlösung genau bekannt sein. Die Versuche wurden mit van't Hoffscher Lösung gemacht, die in ihrer Zusammensetzung das natürliche Seewasser im wesentlichen wiedergibt. Ihre Zusammensetzung ist: Isomolare Lösungen:

100,0 ccm NaCl,
2,2 „ KCl,
1,5 „ $CaCl_2$,
11,6 „ $MgCl_2$.

Ich bezeichne im folgenden die verwendeten Konzentrationen der van't Hoffschen Lösung mit der molaren Konzentration jener Lösungen, aus denen sie zusammengestellt wurde. Es bedeutet demnach 0,1 van't Hoff eine Lösung, die aus 0,1 molaren Lösungen zusammengegossen wurde. Es mag vorgreifend erwähnt sein, daß sich die Salzkombination bei den vorliegenden Versuchen recht gut bewährt hat. Beabsichtigt man jedoch,

dieselbe zu Versuchen zu verwenden, so ist es sehr wesentlich, daß eine gewisse OH-Ionenmenge in Form von Natriumbicarbonat hinzugefügt wird. Ihre Anwendung dürfte sich immer dann empfehlen, wenn es sich darum handelt, mit lebenden Zellen kurzdauernde Versuche in einem Medium von genau bekannter Zusammensetzung durchzuführen. Bei längeren Versuchen wird jedoch bereits der Mangel von Nährsalzen fühlbar.

Es wurden nun eine Reihe Meeresalgen auf ihr Verhalten gegenüber Salzlösungen von steigender Konzentration untersucht.

Verwendet wurden 160 ccm neutraler van't Hoff in den Konzentrationen 0,875, 0,750, 0,625, 0,500, 0,375, 0,250, 0,150 Mol.

1. Vaucheria (marine Form).

Mit Zusatz von $^1/_{2000}$% Neutralrot

1,000 Mol: Zellinhalt plasmolysiert, kugelförmig, keine Färbung.
0,875 „ : Etwas schwächer plasmolysiert, Kugelbildung ist seltener, keine Färbung.
0,750 „ : Beginn der Plasmolyse, viele Zellen nicht plasmolysiert, andere zeigen Plasmolyse. Hin und wieder schwach gefärbte Zellen.
0,625 „ : In den meisten Zellen Krystallbüschel.
0,500 „ : Maximum der Färbung, in den meisten Zellen liegen ungemein zahlreiche, fein zerteilte Büschel von nadeligen Neutralrotkrystallen von sehr zierlichem, bäumchenförmigem Aussehen.
0,375 „ : Schon starke Schädigung, doch geht auch in Zellen, deren Protoplast noch intakt ist, die Färbung zurück.
0,250 „ : Weiteres Zurückgehen der Färbung.

2. Ulva lactuca.

Färbungskurve bereits am 1. Tage des Versuches sichtbar, doch erst am nächsten Tage aufgezeichnet.

1,000 Mol: Einzelne Zellen des Thallus gefärbt.
0,875 „ : Zahl der gefärbten Zellen unverändert.
0,750 „ : „ „ „ „ steigt.
0,625 „ : „ „ „ „ „ } Wenig Unterschiede nachweisbar.
0,500 „ : Maximum der Färbung }
0,375 „ : Färbung geht deutlich zurück.
0,250 und 0,125 Mol: Färbung verschwindet immer mehr.
0,000 Mol: Nur hin und wieder schwach gefärbte Zellen.

Die Beobachtung wurde etwas durch die aufgetretene Membranfärbung gehindert.

3. Nitophyllum punctatum.

Keine deutlichen Unterschiede nachweisbar, nur wenig gefärbt.

4. Cladophora trichotoma.

Resultate ungleichmäßig, in allen Kugeln sind ungefärbte bis intensiv gefärbte Zellen. In der Konzentration 0,125 durchbrechen die Protoplasten die Membran an der Spitze der Zellen und treten als intensiv gefärbte rote Kugeln aus. An einem Faden wurden 3 ineinander geschachtelte, konzentrische Kugeln beobachtet.

5. Udotea Desfontainii.

Die Färbung ist optimal bei 0,875 und 0,750, von da ab nimmt die Färbung sowohl nach oben wie nach unten ab, ohne jedoch völlig zu verschwinden. Die Kontrolle ist durch die Form der Thallus erschwert.

Was bereits in Versuch 1 angedeutet wurde und in Versuch 2 an Elodea gezeigt werden konnte, erscheint durch diese Versuchsserie als einer Erscheinung von allgemeiner Verbreitung dargetan. Sämtliche untersuchten Meeresalgen mit Ausnahme von Cladophora speichern bei der Konzentration des natürlichen Seewassers oder bei einer etwas höheren (Udotea) am meisten Farbstoff. Die aufgenommene Farbstoffmenge nimmt ebenso ab, wenn die Lösung konzentrierter ist, wie wenn sie durch Hinzufügen von Wasser verdünnt wird. Ein stark abweichendes Verhalten zeigt nur Cladophora trichotoma. Wenn man Büschel von dieser vergleicht, die in Salzlösungen von verschiedener Konzentration mit Zusatz von Farbstoff verweilt hatten, so scheint es, als ob der Eintritt des Farbstoffes in die Zellen dieser Alge durch gleichzeitig vorhandene Neutralsalze überhaupt nicht beeinflußt werden könnte.

Cladophora zeigt sehr schön die von Traube, Mengharini und Skala[1]) studierte polare Speicherung des Farbstoffes. In der Regel ist der terminale Pol der Zellen intensiv rot gefärbt, während der basale nicht oder kaum Farbstoff aufgenommen hat. Wie diese Erscheinung zu erklären ist, muß derzeit wohl dahingestellt bleiben, ihre Deutung durch lokalisierte Permeabilität beschreibt nur, ohne das Ursächliche daran zu fassen.

Vorgreifend sei bemerkt, daß die Unterschiede, die sich bei verschiedenen Salzen einstellen, nicht so weitgehende waren, daß es möglich gewesen wäre, eindeutige Schlüsse daraus zu ziehen. Bedeutend schärfer sind die Resultate, die gewonnen

[1]) Traube, Mengharini und Skala, diese Zeitschr. 17, 1906.

wurden, als der Austritt des Farbstoffes aus der Zelle bei Gegenwart verschiedener Salze beobachtet wurde.

In Versuchen, die gemacht wurden, um den Einfluß der einzelnen Kationen auf den Eintritt des Farbstoffes kennen zu lernen, konnte nur bei $Al_2(SO_4)_3$ ein deutlicher Ausschlag beobachtet werden. Dieses Salz hemmt bereits in Konzentrationen von 0,01 Mol im Liter die Aufnahme des Farbstoffes, wobei allerdings zu bemerken ist, daß Al-Salze starker Säuren deutlich sauer reagieren. Im übrigen wurden zwischen

$MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, NaCl einerseits
und zwischen $MgSO_4$, K_2SO_4, Na_2SO_4 andererseits

keinerlei Unterschiede beobachtet, die über das Maß der Variation zwischen zwei Stücken desselben Materials hinauszugehen schienen.

Bedeutend größere Unterschiede kommen jedoch zur Beobachtung, wenn man ein Kation in Bindung an verschiedene Anionen untersucht. Doch auch hier lassen sich die erhaltenen Differenzen nicht zu einer eindeutigen Klärung der vorliegenden Fragen auswerten, wenn man den Eintritt des Farbstoffes in die Zellen verfolgt. Die beiden folgenden Protokolle enthalten Angaben über die Art und Weise, wie verschiedene Natriumsalze den Eintritt von Neutralrot und Methylenblau in die lebende Zelle beeinflussen.

Versuch 1.

Untersucht wurde Elodea in 10 ccm $^1/_{2000}$ %iger Neutralrotlösung. An Salzkonzentrationen wurden geprüft:

1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 Mol im Liter.

Chlorid und Sulfat verhalten sich im wesentlichen gleich. Maximum bei 0,01 und 0,05. Die Zellen sind schwach gefärbt und gut erhalten.

Acetat Serie a ohne Säurezusatz. Die Region des Maximums liegt bei 0,4 und 0,2. Die Zellen sind intensiv gefärbt. In 0,8 und 0,6 sind keine Zellen oder nur wenige gefärbt, ebenso in den unteren Konzentrationen. Die höheren Konzentrationen zeigen etwas stärkere Schädigung als Chlorid und Sulfat, doch ist dies erst über 0,6 festzustellen.

Serie b mit Essigsäurezusatz. Neutralrot als Indicator. Verwendet auf 10 ccm

n	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	Natriumacetat
0,27	0,22	0,18	0,15	0,11	0,3	ccm $^n/_{10}$-Essigsäure.

Die niederen Konzentrationen zeigten keinen Umschlag der Farbe des Neutralrots in Gelb. Der Zusatz von Essigsäure entfiel daher.

Die größte Farbstoffmenge wird in dieser Serie bei 0,1 gespeichert. In 0,2 ist die Färbung teilweise noch zu sehen. In 0,4 ist sie völlig sistiert.

Versuch 2.

Es wurde dieselbe Versuchsanordnung beibehalten wie in Versuch 1; nur trat an die Stelle des Neutralrot Methylenblau.

Chlorid und Sulfat zeigen das Optimum bei 0,01 und 0,05. Hemmung ist fast vollständig in 0,2, in 0,1 ist sie noch deutlich zu erkennen.

Nitrat: Optimum wie bei Chlorid, doch ist die Färbung noch bis 0,4 zu erkennen.

Borat hemmt die Farbstoffaufnahme bei 0,25. $^1/_8$ molar zeigt noch starke Trübung.

Aluminat: Vollständige Hemmung bei 0,01 Mol. Aluminat löst sich nur bis zu etwa 0,2 Mol klar, darüber hinaus bildet es ein trübes Suspensoid, das sich nach einigen Stunden absetzt.

Salicylat hemmt bei 0,001 Mol. Bei 0,05 molar zeigen sich eigentümliche Veränderungen des Chlorophylls. In den Chlorophyllkörnern zeigen sich braune Kugeln, die sich in den höheren Konzentrationen zusammenballen und zu 2 bis 3 in jeder Zelle liegen.

Phosphat: Natrium phosphoricum Merck Na_2HPO_4 konnte wegen mangelnder Löslichkeit nur bis zu 0,1 Mol untersucht werden. Bis dahin wurde eher schwaches Ansteigen der Färbung beobachtet, aber sicher kein Hinuntergehen.

Citrat wurde untersucht in den Konzentrationen 0,1, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 molar. Deutlich ausgeprägtes Maximum bei 0,01, von da ab geht die Färbung nach beiden Seiten zurück. In den höheren Konzentrationen sind die Pflanzen etwas stärker geschädigt als in Chlorid und Nitrat.

Tartrat entspricht in seinem Verhalten völlig dem Citrat.

In der ersten mitgeteilten Versuchsserie zeigten sich demnach zwischen Chlorid und Sulfat keine weitgehenden Unterschiede. Die stark abweichenden Ergebnisse des Acetats sind durch die infolge der Hydrolyse des Salzes vorhandenen OH-Ionen bedingt, wie aus einem Parallelversuche zu ersehen ist, in dem die Hydrolyse durch Zusatz von Essigsäure zurückgedrängt wurde. Doch ist dieser Parallelversuch nur mit einem gewissen Vorbehalt mit dem Versuche mit NaCl und Na_2SO_4 vergleichbar, da die Dissoziationsverhältnisse der Salze bei Zusatz von freier Säure doch wesentlich andere sind als ohne diese. Doch möge immerhin die Feststellung erwähnt werden, daß im Acetat das Maximum bei 0,1, beim Chlorid und Sulfat dagegen wesentlich niedriger, nämlich bei 0,01 und 0,05 liegt.

Leider liegen keine Angaben über die Konzentration von Chlorid und Sulfat vor, die eben imstande ist, die Aufnahme des Farbstoffes zu hemmen, so daß diese nicht mit dem für das Acetat ermittelten Werte verglichen werden können. Ganz auffallend sind die niederen Werte für das Maximum im Chlorid und Sulfat gegenüber den früheren Angaben, hier 0,05 und 0,01 molar, dort 0,3. Diese Abweichung dürfte teilweise ihre Begründung durch das verwendete Gefäßmaterial finden. Die ersten Versuche wurden in Einsiedegläsern aus weichem Glase angestellt, aus denen viel Alkali in Lösung geht. Außerdem wurde zur Herstellung der Lösungen Moldauwasser verwendet, das ebenfalls OH-Ionen enthält. Wenn aber OH-Ionen vorhanden sind, so wird, wie später noch genau zu erörtern sein wird, die Konzentration des Salzes, bei der die größte Farbstoffmenge gespeichert wird, größer. Der vorliegende Versuch ist jedoch in Erlenmeyerkölbchen durchgeführt worden.

In dem Parallelversuche mit Methylenblau findet man für Chlorid und Sulfat dasselbe, was auch schon bei Gegenwart von Neutralrot festgestellt wurde. Die größte Farbstoffmenge speichert die Zelle, wenn Nitrat zugefügt wurde, ebenfalls bei einem Gehalt der Außenlösung an diesem Salze von 0,01 bis 0,05 molar, doch ist hier Färbung bis 0,4 noch deutlich zu erkennen, während sie bei Chlorid und Sulfat nur bis 0,2 bzw. 0,1 nachzuweisen ist. Das Nitrat hemmt demnach die Aufnahme des Farbstoffes bedeutend schwächer als diese beiden Salze.

Was die übrigen untersuchten Salze betrifft, so hemmen Tartrat, Citrat und Salicylat noch stärker als die zuerst beschriebenen anorganischen Salze. Die diesbezüglichen Konzentrationen sind 0,1 für Tartrat und Citrat, 0,001 Mol für Salicylat. Beim Salicylat deuten die in den Chloroplasten auftretenden braunen Kugeln darauf hin, daß Nebenwirkungen vorliegen. Solche kommen auch dem ebenfalls untersuchten Sulfit zu, das bereits in sehr niedrigen Konzentrationen das Methylenblau entfärbt. Dinatriumphosphat, das bis zu einer Konzentration von 0,1 Mol die Farbstoffaufnahme fördert, enthält OH-Ionen.

Wenn man nun versucht, die einzelnen Salze nach der Reihenfolge der Hemmung zu ordnen, so ergibt sich folgende Reihe: Nitrat < Chlorid, Sulfat < Tartrat, Citrat < Aluminat < Salicylat.

Diese stimmt mit der von Hofmeister[1]) ermittelten Fällungsreihe der Anionen überein, und man könnte versucht sein, die Hemmung der Farbstoffaufnahme einfach auf ein Impermeabelwerden des Plasmas infolge der Fällung der Plasmakolloide zurückzuführen; auch das Zurücktreten der Wirkung der Kationen würde dafür sprechen. Doch weisen Erfahrungen, die bei der Beobachtung des Farbstoffaustrittes aus der Zelle gemacht wurden, darauf hin, daß eine so einfache Deutung diese Verhältnisse nicht hinreichend erklärt.

Der Vergleich der aufgenommenen Farbstoffmengen läßt sich nicht mit genügender Sicherheit durchführen, und es ergaben demgemäß auch Versuchsreihen an Spirogyra mit einer Reihe von Kationen Na, Li, K, Ca, Ba, die als Nitrat, Chlorid und Sulfat untersucht wurden, keine Resultate, aus denen es möglich gewesen wäre, eine verbindende Regel herauszulesen. Es zeigten sich wohl Unterschiede zwischen diesen Salzen, doch bestanden diese viel mehr in der mehr oder minder starken Schädigung der Zelle als in Differenzen der Farbstoffaufnahme. Dabei war zwischen Zellerhaltung und Farbspeicherung kein Zusammenhang zu bemerken. Es konnten ebenso häufig intakte Zellen mit reichlicher Farbstoffaufnahme und geschädigte Zellen, die gar keinen Farbstoff gespeichert hatten, beobachtet werden wie umgekehrt.

2. Über die Änderungen der Geschwindigkeit des Farbstoffaustrittes durch steigende Salzkonzentration.

A. Allgemeine Bemerkungen.

Da demnach die Endosmoseversuche zu keinen sicheren Resultaten führten, in welchem Grade der Durchtritt des Farbstoffes durch das Protoplasma durch das Vorhandensein verschiedener Ionen beschleunigt oder verzögert wird, wurde versucht, dieser Frage auf dem entgegengesetzten Wege näherzutreten, es wurde nämlich die Beeinflussung des Austrittes von vorher in der Zelle gespeichertem Farbstoff untersucht. Dabei war es auch möglich die Zellen zu töten, nachdem sie reichlich Farbstoff aufgenommen hatten, und so zu erfahren, welche Bedeutung die Eigentümlichkeiten des lebenden Protoplasmas für die Stoffwanderung besitzen.

[1]) Hofmeister, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 28, 210, 1891.

Die Blätter von Elodea wurden in der Regel mit strömendem Dampf getötet, der aus der feinen Öffnung einer in den Hals eines Kölbchens gesetzten Glasröhre kam. Für diese Versuche bewährte sich Methylenblau besser als Neutralrot, da dieses den getöteten Protoplasten sehr stark färbt und damit die Kontrolle erschwert. Methylenblau dagegen wird auch im getöteten Protoplasma kaum mehr gespeichert als im lebenden. Trotzdem wurde der größte Teil der zu berichtenden Versuche mit beiden Farbstoffen angestellt, um so Vergleichsmaterial zu haben.

Je nach der Art der Tötung ist die Durchgängigkeit des toten Protoplasten verschieden. Um dies festzustellen, wurden Elodeablätter, die Methylenblau gespeichert hatten, auf verschiedene Weise abgetötet, sorgfältig gewaschen und in 50 ccm destilliertem Wasser sich selbst überlassen.

|| bedeutet, daß Niederschläge noch vorhanden sind, — bedeutet, daß die Zellen entleert sind.

Getötet durch	Kontrolle	
	24h	48h
Wasserdampf	||	—
Äther		—
Zinksulfat		||
Chromosmiumsäure n. Fl.	||	||
Pikrinsäure	—	—
Jodwasser	—	—
Jodjodkalium	—	—
Chloroformdampf	||	—
Formaldehyd	—	—
Lebendes Kontrollexemplar	||	||

Der tote Protoplast läßt also den Farbstoff in der Regel vollständig austreten, während aus der lebenden Zelle nur so lange Farbstoff exosmiert, bis dieser eine gewisse Konzentration in der Außenlösung erreicht hat, worauf der weitere Austritt aufhört. Abweichend verhalten sich nur Zellen, die mit Zinksulfat und Flemmingscher Lösung fixiert wurden. Die Fällung der Plasmakolloide durch diese beiden scheint mit einer weitgehenden Denaturierung verbunden zu sein, wodurch der Protoplast sowohl für den Farbstoff wie für den Gerbstoff undurchlässig wird. Am langsamsten tritt der Farbstoff aus Zellen aus, die mit Wasser- oder Chloroformdampf getötet wurden. Dies ist wohl diejenige Methode der Tötung, die die Verhältnisse des lebenden Protoplasten noch am treuesten erhält.

Der Austritt des Farbstoffes aus der Zelle erfolgt im wesentlichen so, wie es Overton[1]) für die Exosmose von Alkaloiden geschildert. Hat der betreffende Pflanzenteil genügend lange in der Farbstofflösung verweilt, so ist schließlich sämtliches Tannin als unlösliches Farbstofftannat ausgefällt worden. Neben den Tannatniederschlägen ist jetzt in

[1]) Overton, Zeitschr. f. phys. Chem. 22, 189, 1892.

der Zelle noch eine kleine Menge hydrolytisch abgespaltener Gerbstoff und Farbstoff vorhanden, doch ist diese so gering, daß der gelöste Farbstoff nicht mikroskopisch bemerkt werden kann. Überträgt man nun diese so gefärbten Zellen in reines Wasser, so tritt der Farbstoff aus der Zelle heraus, das Tannin kann jedoch den Protoplasten nicht passieren. Die Menge des freien Tannins wächst immer mehr, und man erblickt schließlich in der Zelle Niederschläge, die in gefärbten Zellsaft eingebettet liegen, da sich das Farbstofftannat in überschüssigem Gerbstoff löst. Je mehr Farbstoff aus der Zelle heraustritt, desto mehr wird auch die Hydrolyse des Farbstofftannats zurückgedrängt, und der Dauer der Exosmose proportional vermindert sich die Geschwindigkeit des Farbstoffaustrittes. Ist die Menge der Außenlösung im Verhältnis zur austretenden Farbstoffmenge unendlich, so tritt sämtlicher Farbstoff aus den Zellen heraus. Die Niederschläge lösen sich schließlich völlig auf, der blaue Zellsaft blaßt immer mehr aus, bis die Zellen völlig entfärbt sind. Ist jedoch die Menge der Außenlösung begrenzt, so lassen die Zellen den Farbstoff nicht völlig austreten, der Vorgang kommt vielmehr zum Stillstande, sobald die Außenlösung eine bestimmte Konzentration des Farbstoffes enthält.

Bei dieser Schilderung des Ganges des Farbstoffaustrittes aus der Zelle ist angenommen worden, daß in der Außenlösung keine Salze in nennenswerter Menge vorhanden sind. Sind diese jedoch vorhanden, so wird sich namentlich diejenige Gerbstoffkonzentration, bei der gerade eine Auflösung der Farbstofftannatniederschläge eintritt, vergrößern müssen. Es ist bereits auseinandergesetzt worden, daß das Farbstofftannat durch sein Verhalten Salzen gegenüber als typisch suspensoides Kolloid charakterisiert ist. Ist überschüssiger Gerbstoff vorhanden, so ist es gegenüber der fällenden Wirkung von Salzen bedeutend stabiler. Je höher aber der gegebene Salzgehalt der Lösung ist, desto mehr überschüssiger Gerbstoff wird vorhanden sein müssen, damit Farbstofftannat in Lösung bleibt bzw. seine Niederschläge sich auflösen. Es wird demnach im allgemeinen bei Gegenwart eines Salzes die Bildung eines blauen Zellsaftes um so später beobachtet werden können, je größer die fällende Wirkung desselben ist. Diese richtet sich nach den auch sonst für Fällung von Suspensoiden ermittelten Regeln, doch ist, wie daraufgerichtete Versuche ergaben, die Reihenfolge der einzelnen Ionen in bezug auf ihre fällende Kraft einigermaßen von ihrer Konzentration abhängig, und man kann beim Vergleich verschiedener Konzentrationen Abweichungen beobachten.

Der Protoplast toter Zellen ist jedoch auch für das Tannin durchlässig. Dies bedingt wohl zu einem guten Teil die Unterschiede, die zwischen lebenden und toten Zellen im Verlaufe der Exosmose des Farbstoffes beobachtet werden können. Der Zellsaft der toten Zellen enthält keine nennenswerten Mengen freies Tannin und man kann deshalb auch keine Auflösung der Niederschläge feststellen; nur manchmal deutet ein ganz schwach

blaugefärbter Zellsaft darauf hin, daß der Gerbstoff auch den toten Protoplasten etwas langsamer passiert als der Farbstoff. Da Tannin und Farbstoff gleichzeitig die Zellen verlassen, so entfärben sich diese völlig unabhängig von der Menge der Außenlösung.

Von den Faktoren innerhalb der Zellen, die die Geschwindigkeit des Farbstoffaustrittes beeinflussen, ist der Gehalt der Zelle an Gerbstoff wohl am leichtesten zu fassen. Es ist bereits dargetan worden, daß die Zellen um so schneller Farbstoff speichern, je mehr Gerbstoff sie enthalten. Dementsprechend verläßt der Farbstoff auch um so langsamer die Zelle, da ja das Diffusionsgefälle Außenlösung-Zellsaft wesentlich durch die Konzentration des freien Gerbstoffes in der Zelle gegeben ist. Es konnte bei Zellen, die reichen Gerbstoffgehalt hatten, wie die subepidermalen Zellen von Echeveria Scheidekkeri nur eine geringe und langsame Exosmose des Farbstoffes nachgewiesen werden. Da man jedoch den Einwand nicht ohne weiteres zurückweisen kann, daß dieses Verhalten durch gewisse Eigenheiten des betreffenden Protoplasten bedingt sei, schien es nicht überflüssig, die diesbezüglichen Verhältnisse auch in vitro zu studieren. Es wurde folgender Versuch mit Dialysatoren angestellt, die mit dünnem, wohlgewässertem Darm bespannt waren.

In den Dialysatoren befanden sich je 10 ccm Lösung, sie wurden in 200 ccm destilliertes Wasser enthaltende Gefäße gehängt. Im Innern befand sich $^1/_{100}$ %iges Neutralrot, dem in 3 Serien je 0, $^2/_{10}$ und 1 ccm $^n/_{100}$-Gerbsäure Kahlbaum zugesetzt wurden. Die Außenlösung war destilliertes Wasser, in welchem 0, 0,3 und 1 Mol Kochsalz im Liter gelöst war. Die Messung des Versuches erfolgte nach 24 Stunden durch Vergleich mit einer Farbenskala, die aus verschieden konzentrierten Neutralrotlösungen in gleich starken Eprouvetten bestand. Die Skala war folgende:

0,000015 %	0,00003 %	0,00006 %	0,00012 %
1	2	3	4
0,00025 %	0,0005 %	0,001 %	0,01 %
5	6	7	8

Die Messungen ergaben:

		m	0,3	0 Kochsalz
Serie a	0 ccm $^n/_{100}$-Gerbsäure	4	3,5	2
„ b	$^2/_{10}$ ccm „	3,8	2	1
„ c	1 ccm „	binnen 3 Tagen nichts ausgetreten.		

Das ausgetretene Neutralrot verbreitet sich nur in reinem Wasser gleichmäßig, in den übrigen Versuchen bildet es eine

mehr oder minder dichte Zone um die Dialysatormembran. Dieser Versuch hat einwandfrei dargetan, daß der in der Zelle enthaltene Gerbstoff den Austritt des Farbstoffes verlangsamen und sogar zu hemmen vermag, wenn seine Konzentration um einen bestimmten Wert, die vorhandene Farbstoffmenge, überschreitet. Die Werte für den ausgetretenen Farbstoff würden in den salzhaltigen Lösungen wohl noch höher ausgefallen sein, wenn durch öftere Durchmischung für eine gleichmäßige Verteilung des Inhaltes des Dialysegefäßes gesorgt worden wäre.

B. Spezielle Beobachtungen.

Der soeben berichtete Versuch hat zugleich dargetan, daß an künstlichen Membranen ein Zusatz von Salz die dialysierende Menge eines basischen Farbstoffes vergrößert. Es sind dies wohl dieselben Verhältnisse, die Bieletzky[1]) beobachtete, als er die Dialyse der Peroxydase durch tierische Membranen untersuchte. Er fand, daß der Durchtritt dieses Fermentes durch eine Membran durch Salzzusatz gefördert wird.

Um nun eine vorläufige Orientierung darüber zu gewinnen, ob lebende Zellen sich ebenso verhalten wie die eben untersuchten Membranen, wurden annähernd gleiche Mengen von Elodea in gleiche Mengen von destilliertem Wasser gebracht und die ausgetretenen Farbstoffmengen colorimetrisch bestimmt. Die Genauigkeit der Resultate, welche diese Methode liefert, reicht allerdings nicht aus, ihre Beweiskraft für mehr als für die erste Orientierung für hinreichend zu halten. Einmal mangelt vollständig die Möglichkeit, gleiche Mengen Material zur Untersuchung zu bringen: schwerwiegender ist jedoch der Umstand, daß auch die Cellulosemembran die darin gespeicherten Farbstoffmengen austreten läßt und diese so mitbestimmt werden. Da jedoch die Resultate sich mit den auf mikroskopischem Wege gewonnenen qualitativ decken, so mögen sie mitgeteilt werden.

Tunlichst gleiche Partien von Elodea bzw. Vallisneria wurden nach intensiver Speicherung von Neutralrot bzw. Methylenblau eine Zeitlang im Strahle der Wasserleitung gewässert und dann in je 25 ccm Kochsalzlösung übertragen.

	0,4	0,2	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	NaCl	dest. Wasser
Methylenblau Elodea . .	6,4	6,2	6	5	5	5	5		4
Methylenblau Vallisneria .	6,5	6	5,8	5	4,5	4,5	4		4
Neutralrot Elodea . . .	6,4	5,8	4	3	3	3	3		3,6

[1]) Bieletzky, diese Zeitschr. 21.

Den Messungen wurde die Farbenskala des vorigen Versuches zugrunde gelegt.

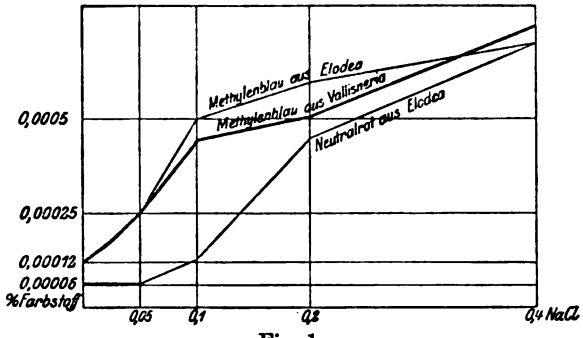


Fig. 1.

Die erhaltenen Messungen lassen sich in der obenstehenden Kurve (Fig. 1) wiedergeben. Die austretende Farbstoffmenge steigt bei den beiden untersuchten Farbstoffen mit der Salzkonzentration, doch steigen die beiden Kurven, die den Austritt des Methylenblau wiedergeben, in der niederen Konzentration bedeutend schneller und steiler an als die des Neutralrot. Niedrige Salzkonzentrationen befördern demnach den Austritt des Methylenblau stärker als den des Neutralrot. Diese Tatsache kann auch mikroskopisch festgestellt werden, worauf ich noch zurückkommen werde. Die colorimetischen Messungen sind in einem willkürlich angenommenen Maße gemacht worden und es fragt sich, inwieweit die für verschiedene Farbstoffe erhaltenen Resultate vergleichbar sind. Die Gerbstoffkonzentration in der Zelle kann also konstant betrachtet werden und es sind äquivalente Farbstoffmengen erforderlich, um sie auszufällen. Da sich nun der Austritt dieser äquivalenten Farbstoffmengen mikroskopisch verfolgen läßt, so lassen sich die auf diesem Wege gewonnenen Beobachtungen einwandfrei vergleichen. Colorimetrische Messungen gestatten dies nur dann, wenn die Farbenskala aus isomolaren Lösungen besteht, doch bieten sie den Vorteil einer anschaulicheren Darstellbarkeit ihrer Ergebnisse. Vergleicht man den raschen Anstieg der Kurven des Methylenblau mit der des Neutralrot, so scheint es nicht unwahrscheinlich, daß der Unterschied zwischen beiden auf den verschiedenen Charakter der beiden Farbstofflösungen zurückzuführen sei. Methylenblau, das bekanntlich echtlöslich ist, wird bereits durch geringe gleichzeitig anwesende Elektrolytmengen von der Plasmahaut verdrängt, während das semikolloide Neutralrot, das duch die entgegengesetzt geladenen Plasmakolloide ausgefällt wurde, bedeutend größere Salzmengen zu seiner Verdrängung erfordert. Für die Wahrscheinlichkeit dieser Auffassung spricht auch die stärkere Adsorption des Neutralrot, die sich darin äußert, daß Methylenblau weder das lebende noch das tote Protoplasma in nennenswertem Maße färbt, während dies durch Neutralrot leicht erreicht werden kann.

Auf gleiche Weise wurden Kotyledonen von Lupinus untersucht, die Neutralrot in Fett gespeichert hatten. Eine völlige Entfärbung der Fetttröpfchen tritt nicht ein, obwohl die Kotyledonen so lange in der Lösung verblieben, bis in dieser Bakterien auftraten, doch war aus denjenigen, die in Salzlösungen lagen, deutlich mehr Farbstoff ausgetreten als aus solchen in reinem Wasser, was sowohl mikroskopisch festgestellt werden konnte, wie es auch makroskopisch aus der stärkeren Rotfärbung der Außenlösung ersichtlich war.

Diese beiden Ergebnisse beweisen also, daß die Farbstoffexosmose aus der Zelle in gewissem Grade unabhängig ist von der Art des speichernden Stoffes in der Zelle. Mag auch der Austritt des Farbstoffes deutlich verlangsamt werden, wenn große Gerbstoffmengen in der Zelle vorhanden sind, so wird er durch Zusatz von Salz zur Außenlösung doch in gleichem Sinne beeinflußt, wie wenn nur eine geringe Gerbstoffkonzentration oder speichernde Fetttröpfchen in der Zelle vorhanden wären.

a) Beeinflussung der Farbstoffexosmose durch verschiedene Kationen.

Es wurde bereits bemerkt, daß colorimetrische Bestimmungen der ausgetretenen Farbstoffmenge diese nicht mit hinreichender Genauigkeit definieren. Dies ist nur mit Hilfe mikroskopischer Kontrolle möglich, die allerdings auch nur Resultate halbquantitativer Natur liefert. Untersucht wurden auf diesem Wege zuerst der Austritt des Neutralrot und des Methylenblau unter Zusatz der Chloride des Na, K, Mg, Ca, Al. Bei der Protokollierung dieser Versuche wurde auch das Auftreten der verschiedenen Stadien des Farbstoffaustrittes berücksichtigt.

Legt man das Schema dieses Vorganges, wie es bereits auseinander gesetzt wurde, der Bezeichnung der einzelnen Stadien zugrunde, so ergibt sich folgender Zeichenschlüssel:

|| Sämtlicher Gerbstoff ist ausgefällt, in der Zelle nur Niederschläge.
(||) Niederschläge liegen in gefärbtem Zellsaft.
() Niederschläge verschwunden, nur mehr gefärbter Zellsaft vorhanden.
— Die Zellen sind entfärbt.

Die einzelnen Zellen lassen den Farbstoff nicht mit der gleichen Geschwindigkeit austreten. Man kann demnach, z. B. bei der Beobachtung der Farbstoffexosmose aus den Zellen eines Blattes von Elodea, in den einzelnen Zellen verschiedene Stadien des Austrittes des Farbstoffes als gleichzeitig vorhanden feststellen. Um dies darstellen zu können,

wurden die obigen Zeichen nach Bedarf kombiniert. Sind nur wenige Zellen (unter ein Viertel) vorhanden, die irgendein Stadium enthalten, so ist dies durch schwachen Druck gekennzeichnet.

Austritt von Neutralrot aus Elodea unter dem Einfluß verschiedener Kationen bei neutraler Reaktion.

Konzentration des Salzes	Kontrolle nach 24 Stunden															
	lebend								tot							
	0,00	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2	0,00	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2
Natrium	‖			‖	‖	(‖)‖	(‖)‖	(‖)‖				−‖	−‖	−	−	−
Kalium			‖	‖(‖)	‖	‖(‖)	(‖)	(‖)(		−‖	−‖	−	−	−	−	−
Magnesium			‖	‖(‖)	‖(‖)	(‖)‖	−(‖)	( )			−	−	−	−	−	−
Aluminium		−	−‖	−‖	‖	‖	‖			−	−	−	−	−	−	
	Kontrolle nach 48 Stunden															
Natrium	(‖)				‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	−(‖)								
Kalium				‖(‖)	‖	‖(‖)	(‖)	−(‖)								
Magnesium			(‖)	(‖)	−()(‖)	−(‖)	−(‖)	−								
Aluminium		−	−‖	−‖	‖	‖	‖									

Austritt von Methylenblau aus Elodea unter dem Einfluß verschiedener Kationen bei neutraler Reaktion.

Konzentration des Salzes	Kontrolle nach 24 Stunden														
	lebend							tot							
	0,00	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2	0,00	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2
Natrium	‖(‖)			‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	(‖)	‖			‖	‖	−‖	−
Kalium		‖(‖)	‖	−(‖)‖	(‖)‖−	(‖)‖	()(‖)		‖	‖	‖	‖	−‖	−
Calcium		‖(‖)	‖	‖(‖)	()‖(‖)	( )	( )		‖	‖	−‖	−	−	−
Magnesium		‖	(‖)‖	(‖)‖	(‖)‖	(‖)	()(‖)		‖	‖	‖	−‖	−	−
Aluminium		‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)			−	−	−	−	−	
	Kontrolle nach 48 Stunden													
Natrium	‖(‖)			‖(‖)	(‖)‖	(‖)‖	−()	−‖			−‖	−	−	−
Kalium		‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)−	‖−(‖)	−(‖)	−()			−‖	−‖	−‖	−	−	−
Calcium		‖(‖)−	‖(‖)	‖(‖)−	‖(‖)	( )	( )			−‖	−	−	−	−	−
Magnesium		‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	−‖(‖)	‖(‖)	(‖)( )			−‖	−‖	−	−	−	−
Aluminium		( )( ) (‖)‖	(‖)‖	‖(‖)	‖(‖)−	‖(‖)				−	−	−	−	−	

In der mit Neutralrot angestellten Versuchsserie kam das Ca nicht zur Untersuchung. Die Ergebnisse sind in den eingeschalteten Tabellen wiedergegeben.

In der Konzentration von $10^{-4} \cdot 5$ Mol $AlCl_3$ ist bei der ersten Kontrolle das Neutralrot aus der Zelle völlig verschwunden. Dagegen zeigten sich in 0,001 Mol bereits in wenigen Zellen Neutralrotniederschläge, die bei einem Gehalt der Lösung von 0,005 Mol bereits in der Hälfte der Zellen anzutreffen sind. Steigert man die Konzentration weiter bis auf 0,1 Mol, so findet man die Niederschläge noch überall völlig intakt. Auch bei den übrigen untersuchten Konzentrationen läßt sich kein Austritt des Methylenblau feststellen.

Das Methylenblau zeigt einen analogen Gang der Änderung der durchtretenden Farbstoffmenge, doch ergeben sich Verschiedenheiten, die als charakteristisch wohl hervorgehoben werden müssen. Während 0,005 Mol bereits genügen, um das Neutralrot völlig aus den Zellen zu verdrängen, beobachtet man in 0,001 Mol in allen methylenblauhaltigen Zellen noch die Farbstoffniederschläge, nur wenige Zellen zeigen blauen Zellsaft, das Kennzeichen des Beginns des Farbstoffaustritts. Allerdings ist $AlCl_3$ ein sehr stark fällendes Salz und es muß demnach wohl auch aus den übrigen Zellen Farbstoff herausgetreten sein, obwohl keine Auflösung des Tannats in ihnen beobachtet werden konnte. Der Zeitpunkt des Eintretens dieser Erscheinung hängt ja, wie bereits erörtert wurde, von der fällenden Kraft des in der Außenlösung vorhandenen Elektrolyten ab. Während nun, wie bereits erwähnt, in 0,001 und 0,005 Mol bereits weniger Neutralrot aus den Zellen heraustritt, steigt die austretende Methylenblaumenge bis 0,01 Mol. Etwa die Hälfte der Zellen zeigt hier die Bildung eines blauen Zellsaftes. Erst bei einer weiteren Steigerung der Al-Konzentration wird der Methylenblauaustritt wieder gehemmt. Bei der zweiten Kontrolle haben sich die Neutralrotmengen in den Zellen kaum verändert. In der Konzentration von 0,001 Mol ist das Methylenblau jedoch bis auf wenige Zellen, in denen sich noch verschiedene Stadien der Auflösung feststellen lassen, völlig aus den Zellen verschwunden. Da auch die Konzentration 0,005 Mol eine Zunahme der Zellen, die einen blauen Zellsaft führen, erkennen läßt, so kann jetzt beim Methylenblau, ähnlich wie beim Neu-

tralrot, ein kontinuierliches Abnehmen der austretenden Farbstoffmenge mit dem Steigen der Menge des zugesetzten Aluminiumsalzes festgestellt werden.

Die toten Zellen sind durch das Al-Ion bereits bei der ersten Kontrolle völlig entfärbt worden.

Wenn man es versucht, die einzelnen Kationen nach ihrer Kraft, den Austritt des Farbstoffes aus der Zelle zu beschleunigen, zu ordnen, so erhält man für tote Zellen ohne weiteres die Reihenfolge

$$Na < K < Mg < [Ca] < Al.$$

Bei lebenden Zellen liegen die Verhältnisse nicht so übersichtlich. Vergleicht man gleiche Konzentrationen der verschiedenen Salze miteinander, so erhält man allerdings in manchen Fällen die obenerwähnte Reihenfolge. Als Beispiel mag die Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ Mol bei Gegenwart von Neutralrot dienen. Das NaCl zeigt noch sämtliche Niederschläge intakt, Kaliumchlorid läßt bereits in. einer Minderzahl von Zellen die charakteristische Bildung eines blauen Zellsaftes beobachten, bei Magnesiumchlorid ist dies in der Hälfte der Fall. $AlCl_3$ hat die meisten Zellen völlig entfärbt.

Auch der Versuch mit Methylenblau zeigt bei einem Salzgehalte der Lösung von 0,2, dann 0,1 und 0,01 Mol mit Ausnahme des Al, dessen Sonderstellung bereits erörtert wurde, die gleiche Abhängigkeit der entfärbenden Kraft eines Salzes von der Stellung in der Fällungsreihe. Doch kann man in beiden Versuchsserien Salzkonzentrationen ausfindig machen, in denen eine Ordnung der Salze nach der aus der Zelle getretenen Farbstoffmenge eine andere Reihenfolge ergibt. Da die durch die Natur der Sache bedingte Methodik keine zahlenmäßigen Messungen zuläßt, die Material zu einer Darstellung der beobachteten Verhältnisse in einer Kurve abgeben konnten, so kann man derzeit auf die Detailanalyse dieser Abweichungen nicht eingehen, zumal ein Teil durch Beobachtungsfehler bedingt sein könnte, die die Variation des Materials mit sich bringt. Gerade diese tritt bei lebenden Zellen stärker hervor als bei toten. Trotzdem läßt sich auch für lebende Zellen die Reihenfolge

$$Na < K < Mg < Ca < Al$$

als für gewisse Konzentrationen sichergestellt annehmen. Allerdings muß man sich bei diesen der Tatsache bewußt bleiben, daß in anderen Konzentrationen gewisse Abweichungen vorliegen.

Wodurch die Sonderstellung des Aluminiums bedingt ist, mag vorläufig unerörtert bleiben. Da die Al-Salze starker Säuren weitgehend elektrolytisch gespalten sind, so enthalten ihre Lösungen immer beträchtliche Mengen freier Mineralsäuren. Die dadurch bedingte saure Reaktion der Lösung trübt die Klarheit der Beziehung etwas. Es wurde jedoch für das Natriumcitrat und Tartrat ein ähnlicher Verlauf der Änderung der austretenden Farbstoffmenge gefunden und es möge bereits hier vorgreifend darauf hingewiesen werden.

Als Unterschied zwischen den beiden Farbstoffen wurde bereits bei der Besprechung der auf colorimetrischem Wege erhaltenen Kurven hervorgehoben, daß die Methylenblaukurven rascher ansteigen als die Neutralrotkurve, die aber auch zu derselben Höhe emporklimmt. Diesem Verlaufe entspricht also eine stärkere Förderung der Exosmose des Methylenblau durch niederere Salzkonzentrationen als des Neutralrotes, während ein höherer Salzgehalt der Außenlösung annähernd gleiche Neutralrot- und Methylenblaumengen austreten läßt. Es ist notwendig, diese Kurven durch die Ergebnisse der mikroskopischen Kontrolle zu verifizieren.

Ich stelle charakteristische Fälle nebeneinander. NaCl 0,2 Mol: Die eine Hälfte der Zellen zeigt bei Neutralrotzusatz rot gefärbten Zellsaft, in denen Niederschläge eingebettet liegen; im übrigen sind die Niederschläge intakt, unversehrte Methylenblauniederschläge sind jedoch in keinem Falle zu finden. Für 0,1 läßt sich aus den Zeichen kein Unterschied entnehmen. In 0,05 Mol ist sogar etwas mehr Neutralrot als Methylenblau aus den Zellen getreten. Doch ist in 0,01 Mol wieder eine stärkere Exosmose des Methylenblau festzustellen.

Auch das KCl kann als Beispiel angeführt werden. 0,2 Mol hat bereits in fast allen Zellen nunmehr durch Methylenblau gefärbten Zellsaft zurückgelassen, während Neutralrotniederschläge mindestens in ebensoviel Zellen enthalten waren, als Zellen soweit entleert wurden, daß nunmehr eine rote Färbung des Zellinhaltes übrig blieb. Auch in der folgenden Konzentration 0,01 Mol ist mehr Neutralrot aus den Zellen getreten; bei einem Gehalte der Außenlösung von 0,05 und 0,01 Mol hat das Methylenblau bereits den dritten Teil der Zellen völlig verlassen, während der Austritt des Neutralrots kaum begonnen hat. Auch in 0,005 Mol ist die Exosmose des Methylenblau etwas weiter fortgeschritten als die des Neutralrots.

Wirkung verschiedener Anionen auf den Farbstoffaustritt.

Die Beeinflussung des Farbstoffaustritts durch verschiedene Anionen wurde an den Salzen des Na untersucht. Auch hier ergibt sich die Fällungsreihe, wenn man die einzelnen Salze nach der Größe der Beschleunigung ordnet, die sie dem Austritte des Farbstoffes erteilen. Bei der ersten Kontrolle des in der Tabelle wiedergegebenen Versuches, der mit Methylenblau angestellt wurde, war die Exosmose des Farbstoffs noch nicht weit genug vorgeschritten, um aus den Zeichen der Tabelle genügende Anhaltspunkte für diese Klassifikation der einzelnen Anionen zu erhalten. Ich wähle demnach die Ergebnisse der zweiten Kontrolle und greife die Konzentration von 0,05 Mol Salz heraus. Die Ionen ordnen sich dann folgendermaßen in der Reihenfolge der stärkeren Entfärbung:

Nitrat < Nitrit < Chlorid < Sulfat, Aluminat < Acetat < Rhodanat < Tartrat < Citrat.

Bezüglich der ersten fünf Ionen ist das in der Tabelle angeführte Zeichen II (II) (die Zellen besitzen zur Hälfte annähernd intakte Niederschläge und zeigen im übrigen bereits die Bildung eines blauen Zellsaftes) nicht ausreichend, um ihre Reihenfolge festzustellen. Doch war hierfür der Vergleich der höheren Konzentrationen ausschlaggebend. Die toten Zellen ergaben eine in wesentlichen Punkten nicht abweichende Reihenfolge. Das Aluminat würde hier seinen Platz an letzter Stelle erhalten, da es das einzige Salz ist, das imstande ist, die toten Zellen bereits im Zeitraum bis zur ersten Kontrolle völlig zu entfärben. Die Wirkung des ersten Aluminats ist jedoch, den Dissoziationsverhältnissen dieses Salzes entsprechend, nicht ohne weiteres der der übrigen Salze gleichzusetzen. Es ist weitgehend hydrolytisch gespalten und es ist einerseits NaOH, andererseits eine kleine Menge Al^{---} und viel kolloidgelöstes Aluminiumhydroxyd vorhanden. Daneben kommen noch Al^{+++}-Ionen in verschwindendem Betrage in Betracht. Wie bereits bemerkt wurde, bildet es keine echte Lösung, sondern ein trübes Suspensoid, das sich aber leicht absetzt.

Weitere Abweichungen sind in bezug auf den Gang der Einwirkung des Tartrats und Citrats festzustellen. Übereinstimmend tritt aus lebenden und toten Zellen bei Anwesenheit der meisten Salze eine größere Farbstoffmenge aus, wenn der Salzgehalt der Außenlösung vergrößert wird. Abweichend davon fördert Tartrat und Citrat in der niedrigsten untersuchten Salzkonzentration den Farbstoffaustritt noch nicht stark, dieser steigt aber jäh an, in der folgenden Konzentration von 0,05 Mol ist bereits die Hälfte der Zellen völlig entfärbt. In 0,2 Mol findet man aber die Niederschläge ebenso intakt wie bei einem ganz geringen Zu-

satz von Na-Citrat. Ich habe zur Schilderung dieser Verhältnisse die Versuchsserie mit Na-Citrat bei der ersten Kontrolle festgehalten. Weniger ausgesprochen, aber trotzdem deutlich und einwandfrei treten sie beim Na-Tartrat sowohl bei der ersten wie bei der zweiten Kontrolle hervor, auch bei Na-Citrat sind sie bei der zweiten Kontrolle noch vorhanden. An getöteten Zellen ist jedoch von diesem charakteristischen Gange der Färbungsintensität nichts zu bemerken. Bereits niedere Konzentrationen lassen hier den Farbstoff aus vielen Zellen völlig austreten, und bei einem größeren Salzgehalt verschwinden schließlich die gefärbten Zellen völlig.

Einfluß der Anionen (Kation $Na^{\cdot}$) auf die Exosmose von Methylenblau aus Elodea.

Konzentration des Salzes	Kontrolle nach 12 Stunden lebend 0	0,001	0,01	0,05	0,1	0,2	0,4	tot 0	0,001	0,01	0,05	0,1	0,2	0,4
Nitrat	‖ (‖)		‖ (‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	‖ (‖)		‖		‖	‖	— ‖	‖	
Nitrit			‖ (‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	‖ (‖)				‖ —	— ‖	— ‖	‖	
Chlorid			(‖) ‖	·	(‖) ( )	(‖) ‖ —	— (‖)			‖	·	— ‖	— ‖	—
Sulfat			(‖)	‖ (‖)	— (‖)	— (‖)				— ‖	— ‖	—	—	
Aluminat		·	‖ (‖)	‖ (‖)	‖	— (‖)			—	—	—	—	—	
Acetat			‖ (‖)	‖ (‖)	(‖) ‖	— ( )				‖	— ‖	— ‖	— ‖	
Rhodanat			‖ (‖)	— (‖)	(‖) [1]	— ( ) [1]				— ‖	— ‖	— ‖	— ‖	
Tartrat			‖ (‖)	— (‖)	(‖)	— (‖)				— ‖	—	— ‖	—	
Citrat			‖ (‖)	— (‖)	— (‖)	‖ (‖)				— ‖	—	— ‖	—	
	Kontrolle nach 36 Stunden.													
Nitrat	(‖) ‖		‖ (‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	‖ —				— ‖	— ‖	— ‖	‖	
Nitrit			‖ (‖)	‖ (‖)	(‖)	(‖) —				‖	— ‖	— ‖	‖	
Chlorid			(‖) ‖	·	(‖) ( )	(‖) —	— (‖)			‖	·	— ‖	—	
Sulfat			(‖) ‖	(‖) ‖	‖ (‖)	—				—	—	—	—	
Aluminat			(‖) ‖	(‖) ‖	‖ (‖)	— (‖)				—	—	—	—	—
Acetat			(‖)	(‖)	— (‖)	( )				— ‖	—	—	—	
Rhodanat			(‖)	— ‖	— ( )	— ( )				—	—	—	— ‖	
Tartrat			— (‖)	—	— (‖)	— (‖)				— ‖	—	—	—	
Citrat			— (‖)	—	— (‖)	(‖)				— ‖	— ‖	—	—	

Die Analogie im Verhalten des Tartrats und Citrats gegenüber den Aluminiumsalzen springt geradezu in die Augen. In beiden

[1]) Dünne Methylenblaunadeln auf den Blättern.

Fällen bei den lebenden Zellen Förderung des Farbstoffaustritts bei einem niederen, dagegen Hemmung bei einem höheren Gehalte an Salz. Allerdings sind die dazu erforderlichen Konzentrationen des Aluminiumions bedeutend kleiner als die des Na-Tartrats oder Citrats. Es genügt bereits ein Gehalt von 0,001 Mol, um eine deutliche Hemmung des Neutralrotaustrittes hervorzubringen; das Methylenblau wird erst bei 0,005 Mol merkbar an der Diffusion durch den Protoplasten gehindert. Dem gegenüber stehen Zahlen von 0,2 bzw. 0,1 Mol, die von Na-Citrat bzw. Tartrat erforderlich sind, um dieselbe Wirkung hervorzubringen. Trotzdem die Zahlenwerte demnach ziemlich weit auseinanderliegen, deutet doch der analoge Gang der austretenden Farbstoffmengen auf eine innere Beziehung zwischen der Wirkung der beiden Salze hin. Fluri[1]) hat auf Grund der von ihm beobachteten Tatsache, daß Spirogyren, die er in niederen Konzentrationen von Aluminiumsalzen eine bestimmte Zeit hatte verweilen lassen, sich nicht mehr durch 10% KNO_3 plasmolysieren lassen, geschlossen, daß eine Behandlung mit Al-Salzen eine weitgehende Erhöhung der Permeabilität des Plasmas bedinge. Diese Erklärung würde wohl den aufsteigenden Ast der Kurve der austretenden Farbstoffmenge decken, doch abgesehen davon, daß sie nur eine Umschreibung der beobachteten Tatsache darstellt, ist sie nicht imstande, die darauf folgende Hemmung des Farbstoffaustrittes wiederzugeben. Die nähere Diskussion dieser Erscheinung mag jedoch bis nach der Mitteilung der an OH- und H-Ionen erhaltenen Ergebnisse verschoben werden, da deren Kenntnis für eine Erklärung nötig ist.

Ergänzende Bemerkungen.

Um noch Anhaltspunkte zur Beantwortung der Frage zu geben, ob man die Einwirkung der Salze auf das Protoplasma als reversibel anzusehen habe oder ob hier tiefer greifende Zustandsänderungen desselben vorliegen, seien folgende zwei Versuchsserien angeführt. War es nach einer bestimmten Dauer der Salzeinwirkung noch möglich, die hemmende Wirkung des Salzes auf die Farbstoffaufnahme durch Auswaschen zu entfernen, so war die erstere Ansicht begründet. Zuerst wurden

[1]) Fluri, Flora 99, 82, 1909.

Elodeablätter in Lösungen verschiedener Natriumsalze von steigender Konzentration gebracht und nach 30stündigem Verweilen in diesen zweimal je für eine Stunde in destilliertes Wasser übertragen. Danach wurden sie in $^1/_{2000}$ %ige Neutralrotlösung gebracht und 12 Stunden darin belassen. Die Ergebnisse enthält folgende Tabelle:

Konzentration	Nitrat	Nitrit	Chorid	Sulfat	Acetat	Aluminat	Rhodanat	Tartrat	Citrat	Neutrales Oxalat
0,005										‖ —
0,01	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	—
0,05	‖	‖	‖	‖		‖ —	‖	‖	—	—
0,1	‖ —	—	‖ —	‖		‖ —	‖ —	‖	—	
0,2	—×○	—	—	—	—		—	—	—	
0,4	—×○	—	—×○	—○	—		—	—×○	—	

‖ = Niederschläge in der Zelle.
— = keine Farbstoffaufnahme.
○ = Plasmolyse nicht mehr zurückgegangen.
× = Idioblasten noch gefärbt.

Daß die Ursache des Unterbleibens der Farbstoffspeicherung nicht etwa darin gelegen war, daß der Gerbstoff aus der Zelle ausgetreten ist, wurde durch Nachweis des Gerbstoffes mit Coffein erwiesen. Demnach muß nach einer bestimmten Einwirkungsdauer des Salzes eine irreversible Zustandsänderung des Protoplasten eintreten. Um eine orientierende Angabe darüber zu gewinnen, wie lange Salz einwirken muß, damit diese Wirkung hervorgebracht werde, wurden Elodeablätter nach 1, 2, 3, 4, 6, 12 und 24stündigem Verweilen in 0,2 mol. Natriumchloridlösung in Neutralrotlösung übertragen. Nach 3stündigem Verweilen war bereits ein deutliches Abflauen der Färbung bei der Kontrolle nach 12 Stunden zu bemerken, nach 4stündigem Verweilen trat überhaupt keine Färbung mehr ein. Da diese bleibenden Änderungen der Protoplasmapermeabilität durch Salzeinwirkung zu denken sind, darüber dürfte sich schwer eine plausible Vorstellung bilden lassen. Als eine durch Koagulation des Protoplasten bedingte Permeabilitätshemmung

wird man sie wohl nicht einfach auffassen dürfen, da gerade bei Gegenwart gewisser Elektrolytmengen die größte Farbstoffmenge die Zelle verläßt. Daß aber die Änderung der Farbstoffdiosmose nicht etwa durch diese Zustandsänderungen des Plasmas bedingt ist, beweist der Umstand, daß sich Verschiedenheiten in der Geschwindigkeit der Farbstoffaufnahme sofort nach Beginn des Versuchs feststellen lassen, wie namentlich durch die Zeitmessungen von Szücz nachgewiesen wurde. Daß aber zu ihrem Eintritt eine gewisse Zeit erforderlich ist, wurde durch die beiden erwähnten Versuchsreihen nachgewiesen. Ein genaueres Eingehen auf die Theorie der mitgeteilten Erscheinungen möchte ich jedoch einer folgenden Mitteilung vorbehalten, die die Bedeutung der OH- und H-Ionen für die Adsorption von Salzen in der Zelle behandeln soll. Erst die Kenntnis dieser vermag eine mehr abgeschlossene Deutung der hier mitgeteilten Versuche zu geben.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Neutralsalze fördern in den niederen Konzentrationen den Eintritt von Farbstoff in die Zelle, bei weiterer Steigerung der Konzentration hemmen sie ihn.

2. Für die Hemmung der Aufnahme ergibt sich folgende Reihenfolge der einzelnen Anionen:

$$\text{Nitrat} < \text{Chlorid} < \text{Sulfat} < \text{Tartrat, Citrat} < \text{Aluminat} < \text{Salicylat}$$

3. Die Unterschiede der einzelnen Kationen treten nicht so deutlich hervor, nur das Al hemmt den Farbstoffeintritt bedeutend stärker.

4. Es wurde der Austritt des Farbstoffes bei Gegenwart verschiedener Neutralsalze untersucht. Es wird durch die einzelnen Ionen in der Reihenfolge:

$$\text{Na} < \text{K} < \text{Mg} < [\text{Ca}] < \text{Al und Nitrat} < \text{Chlorid} < \text{Sulfat} < \text{Tartrat} < \text{Citrat}$$

gefördert. Über die Abweichungen beim Tartrat und Citrat einerseits und beim Al andererseits ist der Text nachzusehen.

Über die Wirkung von Basen und basischen Salzen auf Alkaloidsalze.

Von

J. Traube.

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 5. Juni 1912.)

Die vorliegende Arbeit wurde in ihrem experimentellen Teile bis auf einige ergänzende Versuche bereits vor einem Jahre fertiggestellt.

Den Ausgangspunkt der Untersuchungen bildete eine gelegentliche Beobachtung, wonach ein Zusatz kleinster Mengen von Blutserum zu wässerigen Alkaloidsalzlösungen sehr erheblich deren Oberflächenspannung verminderte. Diese Tatsache wurde um so mehr auf die trotz gegenteiliger Behauptungen vorhandene Alkalescenzwirkung des Blutes zurückgeführt, als etwa gleichzeitig angestellte Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Salze auf die Oberflächenspannung von Alkaloidsalzen gezeigt hatten, daß basische Salze, wie Natriumcarbonat usw., in besonders hohem Maße jene Konstante erniedrigten. Diese Feststellung interessierte namentlich vom Standpunkte meiner Giftstudien aus[1]), zumal ich wiederholt darauf hingewiesen hatte, daß die weitgehendste Parallelität in bezug auf die Erniedrigung der Oberflächenspannung und der Geschwindigkeit der Osmose vorhanden ist.

Da von dieser letzteren Größe wiederum die verschiedensten anderen biologischen Eigenschaften und Vorgänge abhängen, wie Narkose[2]) und Anästhesie, Giftwirkung, therapeutische Wirksamkeit usw., so konnte ich zeigen, daß selbst diese verwickelten

---

[1]) Vgl. J. Traube, Berl. klin. Wochenschr. **1911**, Nr. 10, und Kolloidchem. Beihefte **1912**.

[2]) Vgl. J. Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **105**, 555 u. 556, 1904.

biologischen Vorgänge in so enger Abhängigkeit von der Oberflächenspannung stehen, daß der stalagmometrische Versuch vielfach den Tierversuch zu ersetzen imstande ist. Diese Feststellungen wurden namentlich von E. Přibram[1]) bestätigt, der in sehr schönen Arbeiten gezeigt hatte, daß in der Cocaingruppe die pharmakologische Wirkung des betreffenden Alkaloids durchaus der Oberflächenspannung der wässerigen Lösung entsprach.

In einer diesbezüglichen neueren Arbeit: über Cocainhämolyse[2]) zeigte Přibram, durch eine Arbeit von Gros[3]) und auch durch meine Untersuchungen angeregt, — daß die Hämolyse von Blutkörperchen bei den giftigen Gliedern der Cocainreihe (Novocain, Cocain nnd Eucain) durch Zusatz von Natriumbicarbonat sehr erheblich verstärkt wird, während dies bei den ungiftigen Gliedern jener Reihe (Tropin, Ekgonin, Benzoylekgonin) nur in sehr geringem Grade der Fall war.

Durch jene Arbeit von Přibram wurde ich auf die wertvollen Arbeiten von Gros aufmerksam gemacht, der durch Versuche am Nervus ischiadicus des Frosches, sowie durch Quaddelversuche festgestellt hatte, daß man die anästhesierende Wirkung von Novocain durch Zusatz von Natriumbicarbonat auf das etwa 5fache verstärken kann, sowohl in bezug auf die Geschwindigkeit wie die Dauer der Narkose.

Gros erkannte auch die klinische Bedeutung seiner Beobachtungen, denn auf seine Veranlassung stellte Laewen[4]) durch chirurgische Versuche fest, daß bei der lokalen Anästhesie (bei Zahnoperationen usw.), wo es sich um kleinere Wirkungsbezirke handelt, sowohl in bezug auf die Geschwindigkeit wie Dauer der Wirkung mit Gemischen von Novocainchlorhydrat und Natriumbicarbonat wesentlich günstigere Ergebnisse erlangt wurden, als mit dem Novocainsalze allein.

Gros erwähnt, daß nach den Angaben von Braun[5])

---

[1]) Přibram, Wiener klin. Wochenschr. **21**, Nr. 30; sowie Goldschmidt und Přibram, Arch. f. experim. Pathol. u. Ther. **6**, 1, 1909.

[2]) Přibram, Arch. f. d. ges. Physiol. **137**, 350, 1911.

[3]) Gros, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **63**, 80, 1910 und Münch. med. Wochenschr. **1910**, 2042.

[4]) Laewen, Münch. med. Wochenschr. **1910**, 2044.

[5]) Braun, Die Lokalanästhesie, Leipzig 1905, S. 104.

Bignon bereits durch Einwirkung von Natriumbicarbonat auf eine konzentrierte Lösung von Cocainchlorhydrat eine Cocainmilch erhalten habe von größerer anästhesierender Wirkung, aber er meint, daß sein Verfahren wegen des besseren Gelöstseins der Alkaloidbasen vorzuziehen sei. Die Verstärkung durch das alkalische Salz führt Gros zurück auf eine Hydrolyse verbunden mit gegenseitiger Umsetzung, also auf die stärkere Wirkung der freien und gelösten Alkaloidbase.

Somit zeigte sich, daß meine anfangs erwähnte Beobachtung über die Alkaliwirkung auf Alkaloidsalze nicht mehr neu war, und sie war dies um so weniger, als ich durch eine gelegentliche Korrespondenz mit Herrn v. Prowazek auf eine sehr lesenswerte Arbeit dieses Forschers hingewiesen wurde über Giftwirkung und Protozoenplasma[1]), in der gezeigt wurde, daß die Giftwirkung von Atropin, Strychnin und Chinin auf Colpidien durch Zusatz geringer Mengen von Alkalicarbonaten in hohem Maße gesteigert werden konnte, während ein Zusatz geringer Säuremengen (Salzsäure, Citronensäure) entgegengesetzt wirkte.

Ganz ebenso wurde die Wirkung gewisser basischer Farbstoffe, wie Methylenblau, Azur, Neutralrot durch Zusatz alkalischer Salze erheblich verstärkt. Namentlich bemerkenswert sind v. Prowazeks Untersuchungen über die Veränderungen des Protozoenplasmas, die den Verfasser in völliger Übereinstimmung mit meinen Anschauungen zu der Überzeugung führen mußten, daß es sich bei den Giftwirkungen der Alkaloide usw. im allgemeinen nicht um chemische, sondern wesentlich um physikalische[2]) Vorgänge handelt.

Trotz der vorausgegangenen Arbeiten von Gros, von Prowazek, Přibram u. a. dürften die von mir im folgenden ausgeführten Versuche nicht überflüssig sein, denn Gros' Versuchsanordnung ließ nur Schlüsse zu in bezug auf Anästhetika und von v. Prowazeks Versuche an Protozoen, so interessant sie auch sind, sind doch wesentlich qualitativer Natur. Mir aber schien es in Anbetracht der großen Bedeutung dieser Alkaloidver-

[1]) v. Prowazek, Arch. f. Protistenk. 18, 221, 1910.

[2]) Traube, Kolloidchem. Beihefte 1912 über Oberflächenspannung und Flockung kolloidaler Systeme. Beitrag zur Theorie der Gifte, Arzneimittel und Farbstoffe.

stärkungen namentlich in klinischer Hinsicht wünschenswert, nach Methoden, die quantitative Messungen in bezug auf das gesamte Alkaloidgebiet zulassen, dieses Gebiet nach verschiedenen Richtungen zu bearbeiten. Einmal kam es mir darauf an, zu zeigen, daß der stalagmometrische Versuch bei diesen Versuchen durchaus dem Tierversuch entsprach, dann aber sollte unter anderm die Abhängigkeit der Wirkung von der Natur des Alkalis näher untersucht werden, da gerade diese Untersuchungen Schlüsse zulassen mußten über die wahrscheinliche Ursache der lokalen Wirkungen der Alkaloide.

Versuche mit Cocainchlorhydrat.

Zur Herstellung der hier verwandten meist sehr verdünnten Lösungen bediente ich mich des von mir hergestellten T. K.-Tropfglases. Ist das Glas sorgfältig ausgeführt (worauf allerdings zu achten ist), so kann man nach dieser schnell ausführbaren Methode eine genügend große Gleichmäßigkeit der einzelnen Tropfen erreichen, so daß man bei Angabe der mittleren Tropfengröße (Fehler $\pm 5\%$) für die hier vorliegenden Zwecke die Pipette entbehren kann.

Die Tropfenzahl für Wasser war für das von mir zu allen Versuchen verwandte Stalagmometer = 49,95 Tropfen bei 20°. Das Cocainchlorhydrat wurde in 2%iger Lösung mit Hilfe des T. K.-Glases in eine bestimmte Menge Wasser eingetropft. Ein Tropfen jener Alkaloidlösung entsprach = 0,068 ccm.

Eine Lösung aus 10 ccm dest. Wasser + 10 Tropfen 2%igen Cocainchlorhydrats führte zur Tropfenzahl im Stalagmometer = 49,8, also fast der Tropfenzahl des Wassers. Ein Zusatz nicht alkalischer Salze wie NaCl, K_2SO_4, $CaCl_2$ usw. änderte hieran sehr wenig. So führte beispielsweise eine Lösung von 25 ccm dest. Wasser, 10 Tropfen 2%iger Cocainchlorhydratlösung + 10 Tropfen $^1/_2$ äq. $CaCl_2$-Lösung zu der Tropfenzahl 49,7.

Ganz anders verhielt sich die Lösung bei Zusatz von Natriumcarbonat. (1 Tropfen $^1/_2$ äq. Na_2CO_3-Lösung im T. K.-Tropfglase = 0,085 ccm). Die folgende Tabelle zeigt die große Verminderung der Oberflächenspannung durch Natriumcarbonatzusatz.

		Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm H_2O + 5 Tropfen 2% CoHCl		50,1
10 „ „ + 5 „ 2% „	+ 1 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	55,5
10 „ „ + 5 „ 2% „	+ 2 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	57,45
10 „ „ + 5 „ 2% „	+ 5 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	57,75
10 „ „ + 5 „ 2% „	+ 10 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	57,5
Auf Zusatz von 5 Tr. CoHCl		61,4
„ „ „ weiteren 5 Tropfen CoHCl		64,3
„ „ „ noch 10 „ „		71,0

Die Lösung ist nunmehr ein wenig milchig. Als vorzügliche Indicatoren für das biologische Verhalten der Lösungen erwiesen sich: Kaulquappen, die indessen zweckmäßig nicht zu alt und auch nicht allzu jung sind. Es sei in dieser Hinsicht auf die Arbeit von Bang und Overton über die Wirkungen des Kobragiftes, diese Zeitschr. 31, 244, 1911, verwiesen. Dort ist die Länge der brauchbarsten jungen Kaulquappen angegeben.

Folgende Tabelle enthält eines der verschiedenen Protokolle:

		Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
50 ccm Leitungswasser + 20 Tr. 2% CoHCl		n. 10 Min. beweglos	—
50 „ dest. Wasser + 20 „ 2% „		n. 18 Std. sehr munter	—
50 „ „ „ + 50 „ 2% „		n. 4 Std. noch einige Züge schwimmend	—
50 ccm dest. Wasser + 20 Tr. 2% CoHCl	+ 2 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 10 Min. bewegungslos	51,0
50 „ „ „ + 10 „ 2% „	+ 2 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 34 Min. bewegungslos	50,3
50 „ „ „ + 6 „ 2% „	+ 2 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 38 Min. bewegungslos	50,1
50 „ „ „ + 2 „ 2% „	+ 2 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 40 Min. bewegungslos	50,0
50 „ „ „ + 0 „ 2% „	+ 2 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 48 Std. sehr munter	49,9

Man erkennt, daß man durch Zusatz von Natriumcarbonat die Wirkung des Alkaloides gegenüber den Kaulquappen um mehr als das 25fache steigern kann.

Interessant ist der große Unterschied in der Wirkung von Leitungswasser und dest. Wasser. Daß hierfür nicht etwa die nichtalkalischen Calciumsalze verantwortlich sind, zeigen folgende Versuche.

	Kaul-quappe	Stalagm. Tropfenzahl
50 ccm dest. Wasser + 20 Tr. 2% CoHCl + 10 Tr. $^1/_2$ äq. $CaCl_2$	n. 48 Std. sehr munter	49,8
50 „ „ „ + 20 „ 2% „ + 20 Tr. $^1/_2$ äq. $CaCl_2$	do.	49,7

Anscheinend vermindert Chlorcalcium die Toxizität des in analoger Weise wie auch nach Bang und Overton die Toxizität von Kobragift durch Calciumsalze herabgemindert wird[1]).

Die Wirkung verschiedener Mengen von Natriumcarbonat ergibt sich aus folgenden Tabellen:

	Kaul-quappe	Stalagm. Tropfenzahl
50 ccm dest. Wasser + 20 Tr. 2% CoHCl + 2 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 3 Min. beweglos	51,0
50 „ „ „ + 20 „ 2% „ + 4 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 2 Min. beweglos	54,8
50 „ „ „ + 20 „ 2% „ + 6 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	sogleich beweglos	56,0
50 „ „ „ + 20 „ 2% „ + 10 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	do.	57,1
50 „ „ „ + 10 „ 2% „ + 1 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 30 Min. noch lebend	49,8
50 „ „ „ + 10 „ 2% „ + 2 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 15 Min. beweglos	50,05
50 „ „ „ + 10 „ 2% „ + 3 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 5 Min. beweglos	51,1
50 „ „ „ + 10 „ 2% „ + 5 Tr. $^1/_2$ äq. Na_2CO_3	n. 3 Min. beweglos	52,75

Setzt man in dieselben Lösungen nacheinander Kaulquappen ein, so zeigt sich, daß die zweite Kaulquappe meist länger lebt als die erste, offenbar wegen der Konzentrationsänderung infolge von Oberflächenabsorption[2]).

---

[1]) Siehe l. c. S. 292.

[2]) Es bietet sich hier eine Methode, Adsorptions- und Verteilungskoeffizienten von Giften zwischen Lösung und Tierkörpern zu bestimmen, ebenso zwischen zwei beliebigen Phasen, wobei die Lebensdauer des eingesetzten Tieres den Indicator für das Konzentrationsmaß abgibt.

Es wurden ferner die folgenden Versuche ausgeführt:

										Kaulquappe	Stalagm. Tropfenz.
50 ccm	Wasser	+ 10 Tr.	2%	CoHCl	+ 5 Tr.	½n-Pyridin				n. 6 Std. und länger sehr lebhaft	49,95
50 „	„	+ 0 „	2%	„	+ 5 „	„				do.	—
50 „	„	+ 10 „	2%	„	+ 5 „	Piperidin				n. 4 Min. beweglos	—
50 „	„	+ 0 „	2%	„	+ 5 „	„				n. 17 Min. beweglos	—
50 „	„	+ 10 „	2%	„	+ 5 „	Nicotin				n. 2 Min. beweglos	—
50 „	„	+ 0 „	2%	„	+ 5 „	„				n. 2 Min. beweglos	—
50 „	„	+ 10 „	2%	„	+ 5 „	Triäthylamin				n. 3 Min. beweglos	51,4
50 „	„	+ 0 „	2%	„	+ 5 „	„				n. 3 Std. noch sehr lebhaft	—

Wie zu erwarten war, sind Pyridin und Triäthylamin ziemlich ungiftig, Piperidin sehr giftig, und Nicotin am stärksten giftig. Pyridin[1]) hat die schwächsten basischen Eigenschaften $K = 2{,}28 \cdot 10^{-9}$; die Affinitätskonstante des Triäthylamins ist $K = 6{,}4 \cdot 10^{-4}$ und diejenige des Piperidins $K = 1{,}58 \cdot 10^{-3}$. Je stärker die Basis ist, um so größer ist die in Freiheit gesetzte Alkaloidmenge. Dementsprechend bewirkt der Pyridinzusatz weder eine Änderung der Oberflächenspannung noch eine Änderung der biologischen Wirkung. Beim Triäthylamin ist die Wirkung auf die Oberflächenspannung und die Toxizität etwas erheblicher. In verstärktem Maße gilt dies für Piperidin, während Nicotin an sich zu giftig ist, als daß Schlüsse möglich wären.

Obwohl schon durch die Versuche von Laewen (s. o.) bewiesen ist, daß trotz der Alkalität der Gewebesäfte ein Zusatz von Natriumbicarbonat bei denjenigen Anästhesien nicht gleichgültig ist, wo konzentrierte Cocainlösungen auf einen kleinen Bezirk wirken, dürften die folgenden Versuche (eines der verschiedenen Protokolle) nicht ohne Interesse sein:

---

[1]) Vgl. Pauli, diese Zeitschr. **25**, 513, 1910. — Bredig, Zeitschr. f. physikal. Chem. **13**, 289, 1904.

										Kaul-quappe	Stalagm. Tropfenzahl
50 ccm	Wasser	+ 10 Tr.	2%	CoHCl	+	4 Tr.	Schweine-blut			n. 2 Std. lebhaft	50,3
50 „	„	+ 10 „	2%	„	+	8 „	„			n. 65 Min. beweglos	50,6
50 „	„	+ 10 „	2%	„	+	20 „	„			n. 45 Min. beweglos	52,0
50 „	„	+ 10 „	2%	„	+	2 „	„	+ 2 Tr. $^1/_2$ n-Na_2CO_3		n. 12 Min. beweglos	51,25

Die Natriumcarbonatlösung wirkt demnach mehr als 10 mal so stark toxisch verstärkend als das in geringem Maße alkalisch wirkende Blut, so daß es auch nach diesen Versuchen keineswegs gleichgültig sein dürfte, ob man bei der Leitungsanästhesie Cocainchlorhydrat mit oder ohne Zusatz von geeigneten Alkalien oder alkalischen Salzen verwendet.

Versuche mit Chinin- und Cinchonidinsalzen.

Es wurden zunächst die folgenden Versuche ausgeführt:

									Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm	dest. Wasser	+ 10 Tr.	2%	ChiHCl [1])					50,2
10 „	„	+ 10 „	2%	„	+ 1 Tr.	$^1/_{20}$	äq.	Na_2CO_3	50,3
10 „	„	+ 10 „	2%	„	+ 3 „	$^1/_{20}$	„	„	55,25
10 „	„	+ 10 „	2%	„	+ 5 „	$^1/_{20}$	„	„	59,3
10 „	„	+ 10 „	2%	„	+ 1 „	$^1/_2$	„	„	64,45
10 „	„	+ 10 „	2%	„	+ 2 „	$^1/_2$	„	„	65,0 (Lösung milchig)

Bemerkenswert ist zunächst der Umstand, daß anscheinend erst von einem bestimmten Schwellenwerte des Natriumcarbonatzusatzes ab die durch die Oberflächenspannung meßbare Zersetzung des Chininsalzes vor sich geht (vgl. auch Aconitin), bei 2 Tropfen $^1/_2$ ccm Na_2CO_3 erfolgt eine milchige Chininausscheidung.

Für Cinchonidinchlorhydrat ergab sich folgendes:

									Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm	dest. Wasser	+ 2 Tr.	2%	CinchHCl					49,8
10 „	„	+ 2 „	2%	„	+ 1 Tr.	$^1/_2$	äq.	Na_2CO_3	60,7
10 „	„	+ 2 „	2%	„	+ 3 „	$^1/_2$	„	„	65,5

[1]) 1 Tropfen 2%iger ChiHCl-Lösung am T. K.-Tropfglase entsprach = 0,07 ccm.

Ferner seien folgende Versuche vermerkt:

								Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm	dest. Wasser	+ 10 Tr.	2%	CinchHCl	+ 3 Tr.	1/2 n-Pyridin		50,0
10 „	„ „	+ 10 „	2%	„	+ 3 „	1/2 n-Nicotin		59,2
10 „	„ „	+ 10 „	2%	„	+ 3 „	1/2 n-Piperazin[1])		60,3
10 „	„ „	+ 10 „	2%	ChiHCl	+ 3 „	1/2 n-Pyridin		51,05
10 „	„ „	+ 10 „	2%	„	+ 5 „	2% Antipyrin		50,3
10 „	„ „	+ 10 „	2%	„	+ 2 „	1/2 n-Nicotin		63,5
10 „	„ „	+ 10 „	2%	„	+ 1 „	0,25% ige Tinct. Strychni		65,2
10 „	„ „	+ 20 „	1%	ChiHJ	+ 3 „	1/2 n-Pyridin		50,8
10 „	„ „	+ 20 „	1%	„	+ 1 „	1/4 äq. Na_2CO_3		57,9
10 „	„ „	+ 20 „	1%	$ChiNO_3$	+ 1 „	1/4 „	„	57,9
10 „	„ „	+ 20 „	1%	ChiHCl	+ 1 „	1/4 „	„	55,7
10 „	„ „	+ 20 „	1%	Chiacetat	+ 1 „	1/4 „	„	59,1
10 „	„ „	+ 20 „	1%	Chi-valerianat	+ 1 „	1/4 „	„	60,5
10 „	„ „	+ 40 „	0,5%	$ChiSO_4$	+ 1 „	1/4 „	„	60,3

Man erkennt auch hier, daß die Stärke der Basen maßgebend ist für die Zersetzung der Alkaloidsalze.

Die schwächeren Basen Pyridin und Antipyrin wirken im Gegensatze zum Nicotin und Piperazin nur sehr wenig. Man kann also die relative Stärke der zugesetzten Basen auf diesem einfachen capillarimetrischen Wege außerordentlich scharf bestimmen und ebenso die Stärke der Alkaloidbasen, denn wie wir weiter unten sehen werden, handelt es sich hier lediglich um einen Verteilungsvorgang.

Wenn man danach ein Salz einer schwächeren Alkaloidbase mit einer freien stärkeren Alkaloidbase zusammenbringt, so sollte man erwarten, daß eine Umsetzung stattfindet, die pharmakologisch sehr bedeutungsvoll sein würde. Der obige Versuch mit Tinct. Strychni (brucinhaltig) scheint für die Möglichkeit einer solchen Umsetzung zu sprechen. Indessen Versuche mit Morphin- und Chininchlorhydrat führten zu einem negativen Ergebnis, obwohl Morphin vermutlich stärkere basische Eigenschaften hat als Chinin. Vielleicht sind doch die basischen Eigenschaften der meisten Alkaloide zu schwach, um sich bemerkbar zu machen, indessen diese Frage ist in Hin-

[1]) Die Affinitätskonstante K ist $= 6{,}4 \cdot 10^{-5}$, siehe l. c.

sicht auf die Wirkung gemischter Alkaloide, Tinkturen wichtig genug, um eingehend untersucht zu werden.

Sicher ist es, daß man auf diesem Wege die relative Basizität der verschiedenen Alkaloide in einfachster Weise feststellen kann, wenn man äquivalente Lösungen eines entsprechenden Salzes mit der gleichen Menge Natriumcarbonatlösung versetzt. Es wird sich weiter unten zeigen, daß es Alkaloide gibt, deren Salze durch Natriumcarbonat nicht zersetzt werden. Die Versuche mit verschiedenen Chininsalzen wurden ausgeführt, um die relative Festigkeit der Bindung des Chinins gegenüber den verschiedenen Säuren festzustellen; indessen auch hier sind noch größere Versuchsreihen erforderlich.

Von den Versuchen mit Kaulquappen seien die folgenden veröffentlicht:

						Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
50 ccm dest. Wasser	+ 10 Tr.	2%	ChiHCl			n. 6 Std. u. länger sehr munter	50,0
50 „ „ „	+ 10 „	2%	„	+ 1 Tr. $^1/_2$äq. Na_2CO_3		n. 4 Std. noch munter	53,4
50 „ „ „	+ 10 „	2%	„	+ 2 Tr. $^1/_2$äq. Na_2CO_3		n. 3 Std. tot	58,6
50 „ „ „	+ 10 „	2%	„	+ 3 Tr. $^1/_2$äq. Na_2CO_3		n. 30 Min. noch schwache Zuckungen	59,4
50 „ „ „	+ 20 „	2%	„	+ 1 Tr. $^1/_2$äq. Na_2CO_3		n. 90 Min. tot	56,0
50 „ „ „	+ 20 „	2%	„	+ 3 Tr. $^1/_2$äq. Na_2CO_3		n. 20 Min. noch schwache Krämpfe	61,0
50 „ „ „	+ 20 „	2%	Chi	+ 50 Tr. Schweineblut		n. 2 Std. sehr munter	58,0
50 „ „ „	+ 5 „	2%	„	+ 5 Tr. $^1/_2$äq. Na_2CO_3		n. 2 Std. die letzten Krämpfe	56,6
50 „ „ „	+ 2 „	2%	„	+ 5 Tr. $^1/_2$äq. Na_2CO_3		n. 2 Std. sehr munter	51,8
50 „ „ „	+ 50 „	2%	„	+ 0 Tr. $^1/_2$äq. Na_2CO_3		nach $2^1/_2$ Std. die letzten Krämpfe	—

Ein Vergleich mit der entsprechenden Konzentration beim Cocain führt zu dem Ergebnisse, daß beim Chinin die durch die gleiche Menge Natriumcarbonat herbeigeführte Oberflächenspannungsänderung weit erheblicher ist als beim Cocain, woraus auf eine wesentlich geringere Affinität der anscheinend

schwächeren Base Chinin zu schließen sein dürfte. Andererseits zeigt sich, daß das Chinin, obwohl es nach starken Krämpfen zum Tode führt, weit weniger giftig für die Kaulquappe ist als Cocain, da bei stalagmometrischen Tropfzahlen, bei denen bei den Cocainversuchen die Kaulquappen fast bewegungslos wurden, in Chininlösungen dieselben noch stundenlang munter sind.

Der Versuch mit Schweineblut zeigt auch hier eine geringe Alkaliwirkung des Blutes.

Vergleichende Versuche mit den oben S. 478 genannten Chininsalzen [v. E. Merck[1])] ergaben nun eine ganz auffallend größere Giftigkeit des Chininnitrates. Während in entsprechenden Lösungen des Chlorides, Jodides, Valerianats die Kaulquappen etwa 90 Minuten am Leben waren, starben sie in den betreffenden (säurefreien) Nitratlösungen nach etwa 20 Minuten.

Aus einem Vergleiche des letzten und drittletzten Versuches in vorstehender Tabelle ergibt sich, daß man durch Natriumcarbonatzusatz die Wirkung des Chinins etwa verzehnfachen kann.

Beachtenswert war die wiederholt bestätigte Beobachtung, daß $1\,^0/_0$ige Lösungen von Chininchlorhydrat, die in einem Glase aufbewahrt waren, mit der Zeit vermutlich infolge des Alkaligehalts des Glases aktiver wurden. So zeigte eine derartige frisch hergestellte Lösung die Tropfenzahl 54,7, eine 2 Monate alte Lösung die Tropfenzahl 59,5.

Bei Atropinsulfat-, Dioninchlorhydratlösungen usw. wurden keine derartig erheblichen Verstärkungen der Lösungen beobachtet. Man sollte hiernach meinen, daß etwa für klinische Zwecke gemischte Lösungen von Alkalicarbonat und Alkaloidsalzen besonders haltbar seien; dieses ist aber keineswegs der Fall, indem bei allen derartigen Lösungen in den untersuchten Konzentrationen, ohne daß sichtbare Ausscheidungen erfolgen, schon nach 2 bis 3 Tagen die Tropfenzahl sich immer mehr dem Werte näherte, der der carbonatfreien Alkaloidlösung entsprach. Die Dosierung der aktivierten Alkaloidsalze wird daher am besten in Form gemischter Tabletten erfolgen (siehe weiter unten Anmerkung).

[1]) Auch sämtliche anderen Alkaloidsalze verdanke ich der Firma E. Merck.

Versuche mit Aconitinchlorhydrat.

Aus meinen Protokollen seien folgende Versuche veröffentlicht:

													Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm	dest.	Wasser	+	10	Tr.	2%	AkHCl						51,8
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 1	Tr.	½	äq.	Na_2CO_3	56,8
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 3	„	½	„	„	57,0
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 5	„	½	„	„	65,3 (völlig klar)
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 1	„	½	„	KOH	65,65
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 3	„	½	„	„	66,9
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 1	„	½	„	Pyridin	52,4
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 5	„	½	„	„	53,3
50	„	„	+	100	„	2%	„					Kaulquappe nach 90 Min. die letzten Krämpfe	—
50	„	„	+	10	„	2%	„					nach 18 Std. sehr munter	50,0
50	„	„	+	10	„	2%	„	+ 1 Tr. ½ äq. Na_2CO_3				n. 18 Std. noch lebend	50,3
50	„	„	+	10	„	2%	„	+ 2 Tr. ½ äq. Na_2CO_3				mehrere Std. lebend	54,8
50	„	„	+	10	„	2%	„	+ 4 Tr. ½ äq. Na_2CO_3				10 Min. unter heft. Krämpfen sterbend	56,0

Die Versuche führen im wesentlichen zu einem ganz analogen Ergebnisse, wie diejenigen für Cocain und Chinin. Auch hier muß die durch das Alkali herbeigeführte Oberflächenspannungserniedrigung wie beim Chinin erst recht erheblich sein, damit die pharmakodynamische Wirkung bemerkbar wird.

Aus den Versuchen mit Cocain, Chinin und Aconitin folgt, daß die Alkalimenge, die erforderlich ist, um eine bestimmte Oberflächenspannungsverminderung hervorzubringen, mit wachsender Konzentration der Alkaloidlösung abnimmt. Dieses Ergebnis ist für die praktische Verwendung von Gemischen oder gemischten Lösungen zu beachten.

Versuche mit Atropinsulfat und Atropin.

													Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm	dest.	Wasser	+	10	Tr.	2%	$AtSO_4$						49,75
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 1	Tr.	½	äq.	Na_2CO_3	56,0
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 3	„	½	„	„	58,9
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 3	„	½	„	Pyridin	50,1
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 3	„	½	„	Nicotin	53,5
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 3	„	½	„	Piperazin	53,95
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 3	„	½	„	Triäthylamin-	57,8
10	„	„	+	10	„	2%	„	+ 3	„	½	„	Piperidin	60,1

									Kaulquappen	Stalagm. Tropfenzahl
50 ccm	dest.	Wasser	+	30 Tr.	1%	$AtSO_4$			n. 24 Std. lebend	49,75
50 „	„	„	+	30 „	1%	„	1 Tr. 1% Na_2CO_3		n. 24 Std. lebend	49,9
50 „	„	„	+	30 „	1%	„	3 Tr. 1% Na_2CO_3		n. 24 Std. lebend	50,6
50 „	„	„	+	30 „	1%	„	8 Tr. 1% Na_2CO_3		n. 24 Std. lebend	52,05
50 „	„	„	+	60 „	1%	„			n. 24 Std. lebend	49,9
50 „	„	„	+	60 „	1%	„	+ 6 Tr. 1% Na_2CO_3		n. 24 Std. tot	52,4
50 „	„	„	+	60 „	1%	„	+ 20 Tr. 1% Na_2CO_3		n. 1 Std. tot	55,1
50 „	„	„	+	120 „	1%	„	+ 20 Tr. 1% Na_2CO_3		n. 10 Min. letzte Zuckungen	55,6
10 „	1%	$AtSO_4$							n. 4 Std. tot	52,2
10 „	1%	„	+	1 Tr.	1%	Na_2CO_3				55,0
10 „	1%	„	+	1 ccm	1%	„				63,1
10 „	1%	„	+	2 „	1%	„				66,0

Bei weiterem Zusatz von 1%iger Natriumcarbonatlösung treten keine Fällungen oder Trübungen auf.

Auch mit Daphnien (Wasserflöhen) wurden Versuche gemacht, deren Ergebnisse denen mit Kaulquappen entsprachen.

Das Atropin ist hiernach ein weit schwächeres Gift für Kaulquappen und Daphnien, als Cocain, Aconitin und Chinin. Auch die stalagmometrischen Messungen stehen hiermit im Einklang.

In 1%igen Atropinsulfatlösungen starben die Kaulquappen erst in etwa 4 Stunden, in 1%igen Lösungen von Chininchlorhydrat in etwa 50 Minuten und in 1%igen Lösungen von Cocainchlorhydrat waren sie bereits nach etwa 9 Minuten bewegungslos.

Je giftiger das Alkaloidsalz als solches sich im Tierveruche zeigt, um so größer ist auch meist der Einfluß des Alkalisalzes auf die Tropfengröße und um so größer hat sich auch im allgemeinen der vergiftende Einfluß des Alkaloidsalzes auf andere kolloidale Systeme, wie Wollviolett, Lecithinsuspension, Seifenlösung usw. erwiesen. Vergleiche in dieser Beziehung meine erwähnte Arbeit in den Kolloidchem. Beiheften. Bemerkenswert ist, daß eine 1%ige Lösung von Atropinsulfat oder Cocainchlorhydrat usw. durch

eine 1 %ige Lösung von Natriumcarbonat bei beliebigen Mengenverhältnissen nicht getrübt wird. Hieraus folgt, daß wir die Wirkung des Alkalis nicht etwa so deuten dürfen, daß die freie Alkaloidbase völlig in Freiheit gesetzt wird, sondern es kann sich in Anbetracht der geringeren Löslichkeit des freien Atropins hier wie in allen anderen Fällen nur um einen Verteilungszustand zwischen Base, Kohlensäure und unzersetzten Salzen handeln, der abhängt von der Stärke der beiden vorhandenen Basen.

Daß diese Annahme zutrifft, wird noch durch folgende Versuche bestätigt.

1 Teil Atropin soll sich nach Angaben in Beilsteins Handbuch in 300 Teilen Wasser lösen. Nach meinen Feststellungen ist die Löslichkeit nicht ganz so groß. Ich stellte mir 0,15, 0,10 und 0,05 %ige wässerige Lösungen von Atropin her. Die stalagmometrischen Tropfenzahlen waren 59,3 bzw. 57,45 bzw. 54,65. In der 0,15 %igen Atropinlösung starben die Kaulquappen nach etwa 15 Minuten, in der 0,10 %igen lagen sie nach etwa 30 Minuten in den letzten Zuckungen und in den Lösungen von 0,05 % waren nach 1 Stunde die Schwimmbewegungen noch äußerst schwach.

Bedenkt man, daß in 1 %igen Lösungen von Atropinsulfatlösungen die Kaulquappen etwa 4 Stunden lang lebten, während dieselben in 0,1 %igen Lösungen der freien Base in 30 Minuten starben, so erkennt man einesteils den außerordentlichen, vielleicht allzu wenig beachteten Unterschied der Giftwirkung der freien und im Salze gebundenen Alkaloidbasen, andererseits werfen diese Versuche ein helles Schlaglicht auf die weiter unten behandelten lokalen Wirkungen der Alkaloidsalze.

In hohem Grade beachtenswert ist nun die Tatsache, daß die 0,15 %ige wässerige Lösung von Atropin, die am ersten Tage die Tropfenzahl 59,3 zeigt, am folgenden Tage die Tropfenzahl 55,25 und nach weiterer Prüfung nach 10 Tagen bei völliger Klarheit der Lösung die Tropfenzahl 49,75 ergab (Wasser = 49,9). Die Lebensdauer von Kaulquappen betrug am 1. Tage 15 Minuten, am 2. Tage 30 Minuten und nach 10 Tagen 2 bis 3 Stunden.

Es handelt sich nach meiner Ansicht hier höchstwahrscheinlich um eine zunehmende Entgiftung der Alkaloide durch kolloidale Polymerisation, und wir würden hier einen neuen Beweis erhalten für den von mir in meiner Abhandlung in den Kolloidchemischen Beiheften aufgestellten Satz, daß ein Gift oder Toxin um so ungiftiger wird, je mehr sich dasselbe ultramikroskopisch oder mikroskopisch aggregiert.

Physostigminchlorhydrat, Pilocarpinchlorhydrat und Atropinsulfat.

Diese drei Alkaloidsalze werden bekanntlich in erster Linie in der Augenpraxis verwandt. Physostigmin und Pilocarpin in der gleichen Richtung, wobei bekannt ist, daß Physostigmin wesentlich stärkere Wirkungen entfaltet als Pilocarpin. Pilocarpin wirkt antagonistisch gegenüber dem Atropin. Ganz diesem Verhalten entsprechen die folgenden Versuchsergebnisse.

	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 1 % iges Physostigminchlorhydrat	51,55
10 „ + 1 Tropfen 1 % iges Na_2CO_3	53,4
10 „ + 1 ccm „ „	59,1
10 „ + 2 „ „ „	61,8
10 „ + 3 „ „ „	63,0

Die Lösung bleibt auch bei weiterem Zusatz von 1 %igem Natriumcarbonat völlig klar.

	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm 2 % iges Pilocarpinchlorhydrat	50,95
10 „ + 1 Tropfen 1 % iges Na_2CO_3	51,0
10 „ + 1 ccm „ „	52,3
10 „ + 2 „ „ „	53,7
10 „ + 3 „ „ „	54,0
10 „ + 5 „ „ „	54,8
10 „ + 10 „ „ „	57,4

Die Lösungen bleiben völlig klar.

	Stalagm. Tropfenzahl
50 ccm Wasser + 30 Tr. 1 % Atropinsulfat + 3 Tr. 1 % Na_2CO_3	50,6
50 „ „ + 30 „ 1 % „ + 8 „ 1 % „	52,05
50 „ „ + 30 „ 1 % „ + 3 „ 1 % „ + 30 Tr. 1 % Pilocarpinchlorhydrat	50,1
50 ccm Wasser + 30 Tr. 1 % Atropinsulfat + 8 Tr. 1 % Na_2CO_3 + 30 Tr. 1 % Pilocarpinchlorhydrat	50,1
50 ccm Wasser + 60 Tr. 1 % Atropinsulfat + 20 Tr. 1 % Na_2CO_3	55,1
50 „ „ + 120 „ 1 % „ + 20 „ 1 % „	55,6
50 „ „ + 60 „ 1 % „ + 20 „ 1 % „ + 60 Tr. 1 % Pilocarpinchlorhydrat	50,1
50 ccm Wasser + 120 Pr. 1 % Atropinsulfat + 20 Tr. 1 % Na_2CO_3 + 120 Tr. 1 % Pilocarpinchlorhydrat	50,3

Meine Kaulquappenversuche ergaben, daß in 1%igen Lösungen von Physostigminchlorhydrat die Kaulquappen nach etwa 50 Minuten in den letzten Zuckungen lagen, in 1%igen Lösungen von Atropinsulfat lebten sie, wie bereits erwähnt wurde, etwa 4 Stunden, in den 1%igen Lösungen des Pilocarpinsalzes waren dieselben nach 6 Stunden und länger sehr fidel.

Weitere Versuche, über welche Frau Dr. Tschernorutzky später berichten wird, ergaben, wie zu erwarten war, eine völlige Parallelität der Wirkung des Natriumcarbonats auf das Stalagmometer und den Kaulquappenversuch.

Die obigen Versuche zeigen, daß in der Tat Physostigmin weit giftiger und arzneilich wirksamer ist als Pilocarpin; dementsprechend zeigt sich auch hier das beachtenswerte Ergebnis, daß die Physostigminwirkung durch die gleiche Menge Natriumcarbonat in weit höherem Maße verstärkt wird, als die Pilocarpinwirkung. An anderer Stelle (siehe Kolloidchem. Beihefte, l. c.) zeigt sich, daß durch Physostigminsalze auch die Oberflächenspannung anderer kolloidaler Systeme (wie Wollviolett usw.) weit erheblicher erniedrigt wird als durch Pilocarpinsalze. Wie aber die Kaulquappenversuche von Frau Dr. Tschernorutzky zeigen, wirkt Physostigmin in keiner Weise antagonistisch gegenüber Pilocarpin.

Dagegen bestätigten meine stalagmometrischen Versuche, wie auch meine Versuche mit Kaulquappen und Daphnien durchaus die antagonistischen Wirkungen von Atropin und Pilocarpin.

Wir sehen, wie durch Zusatz von gleichen Mengen Pilocarpinsalz zu den durch Natriumcarbonat stark aktivierten Lösungen von Atropinsulfat die Tropfenzahlen von 55,1 und 55,6 auf 50,1 bzw. 50,3, also fast auf die Tropfenzahl des Wassers (= 49,9) zurückgingen. Aus Gründen, welche noch weiter aufgeklärt werden sollen, erfährt also die Abscheidung des freien Atropins aus seinem Salze durch Pilocarpinzusatz einen völligen Rückgang.

Während Kaulquappen in den ersten beiden Lösungen in etwa 1 Stunde bzw. in etwa 15 Minuten starben, waren sie in den Atropin-Pilocarpingemischen viele Stunden lang höchst

munter. Dasselbe Verhältnis der Lebensdauer ergab sich für Daphnien[1]).

Es ist besonders beachtenswert, daß die antagonistischen Wirkungen von Pilocarpin und Atropin auch eintreten beim Versetzen einer wässerigen Lösung von freiem Atropin (0,15%ig) mit einer Lösung von Pilocarpinchlorhydrat, wie die folgenden Versuche zeigen:

	Tropfenzahl n. 24 Stunden	Kaulquappen
0,15%ige Atropinlösung	55,25	n. 30 Min. tot
20 ccm dieser Lösung + 0,1 ccm PilocHCl	54,2	—
20 „ „ „ + 0,3 „ „	52,0	—
20 „ „ „ + 0,6 „ „	50,0	n. 1½ Stunden noch munter schwimmend

Die antagonistische Wirkung des Pilocarpins dürfte somit auf eine Entgiftung des Atropins durch Beschleunigung seiner von mir als kolloidale Polymerisation gedeuteten physikalischen Zustandsänderung zurückzuführen sein.

Versuche mit Morphinchlorhydrat, Scopolaminchlorhydrat und Dioninchlorhydrat[2]).

		Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm dest. Wasser + 20 Tr. 1% MoHCl[3])		49,7
10 „ „ „ + 20 „ 1% „	+ 1 Tr. ½ äq. Na_2CO_3	50,0
10 „ „ „ + 20 „ 1% „	+ 5 Tr. ½ äq. Na_2CO_3	50,2
50 ccm dest. Wasser + 100 Tr. 1% MoHCl	Kaulquappen n. 8 Tagen sehr munter	49,9
50 „ „ „ + 20 „ 1% „ + 3 Tr. ½ Na_2CO_3	n. 8 Tagen sehr munter	50,0
50 ccm dest. Wasser + 20 Tr. 1% MoHCl + 5 Tr. ½ Na_2CO_3	n. 8 Tagen sehr munter	50,0

[1]) Siehe die Versuche mit Atropin und Pilocarpin bei Protozoen von Prowazek, l. c. S. 243.

[2]) Der Tropfen der 1%igen Lösungen von Morphin-, Dionin- und Scopolaminchlorhydrat war = 0,090 ccm.

[3]) Die Versuche mit Morphin und Scopolamin zeigen, daß die von Bürgi u. a. untersuchte verstärkende Wirkung von Morphin durch Scopolamin mit den hier untersuchten Erscheinungen nichts zu tun hat.

Das Morphin scheint hiernach zu fest mit der Säure verbunden, als daß es durch Natriumcarbonat hydrolysiert wird. Demgemäß übt hier der Alkalizusatz weder eine Wirkung auf die Oberflächenspannung aus, noch beeinflußt derselbe die pharmakodynamische Wirkung.

Ähnlich verhält sich das Scopolaminchlorhydrat.

								Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm	dest.	Wasser	+ 10 Tr.	1%	ScoHCl			49,6
10 „	„	„	+ 10 „	1%	„	+ 1 Tr. ½ äq. Na_2CO_3		50,3
10 „	„	„	+ 10 „	1%	„	+ 5 Tr. ½ äq. Na_2CO_3		51,0
50 „	„	„	+ 20 „	1%	„			Kaulquappen n. 24 Stunden sehr munter
50 „	„	„	+ 20 „	1%	„	+ 3 Tr. ½ äq. Na_2CO_3		n. 24 Stunden sehr munter

Ganz anders als das Morphinchlorhydrat (und Scopolaminchlorhydrat) verhielt sich das entsprechende Salz des Äthylmorphins, das Dioninchlorhydrat[1]). Dies zeigen die folgenden Versuche:

								Stalagm. Tropfenzahl
50 ccm	dest.	Wasser	+ 20 Tr.	1%	DiHCl			49,85
50 „	„	„	+ 20 „	1%	„	+ 5 Tr.	1% Na_2CO_3	52,0
50 „	„	„	+ 20 „	1%	„	+ 15 „	1% „	52,3
10 „	einer 1%igen Lösung von				„			50,65
10 „	„	„	„	„	„	+ 1 ccm	1% „	60,6
10 „	„	„	„	„	„	+ 2 „	1% „	64,0
10 „	„	„	„	„	„	+ 3 „	1% „	66,2
10 „	„	„	„	„	„	+ 4 „	1% „	66,4
10 „	„	„	„	„	„	+ 5 „	1% „	66,8

Kaulquappen und Daphnien starben in den mit Alkalicarbonat versetzten Lösungen entsprechend eher als in den reinen Lösungen.

In 1%igen Lösungen von Morphin- und Scopolaminchlorhydrat waren die Kaulquappen nach 6 und mehr Stunden sehr munter, in 1%igen Lösungen von Dioninchlorhydrat zeigten sie nach etwa 80 Minuten keinerlei Reflexe mehr.

[1]) Auch das Codein und Narkotin verhielten sich durchaus anders, vgl. die später zu veröffentlichenden Versuche von Frau Dr. Tscherno-rutzky.

Versuche mit Alkaloidgemischen.

Aus pharmakologischen Gründen wurden die folgenden Präparate noch untersucht.

Die Wirkung einer natürlichen 0,25%igen Strychnintinktur, die ich Herrn Prof. Thoms verdanke, ergab im Gegensatz zu einer gleich starken künstlichen derartigen Tinktur bei Zusatz von Na_2CO_3 eine geringe Steigerung der Tropfenzahl, wegen der teilweisen Bindung der Alkaloidbasen an Pflanzensäuren in den natürlichen Tinkturen.

Glykosidhaltige Tinkturen, wie Tinctura digitalis, ferner colchicinhaltige Tinkturen (Alberts Remedy) wurden durch Zusatz von Natriumcarbonat kaum beeinflußt. Dagegen ist bei Anwendung von Tinct. Opii simpl. ein Zusatz von Natriumcarbonat trotz der Alkalität der Darmsäfte sehr wahrscheinlich von Vorteil, wie folgende Versuche zeigen.

	Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm dest. Wasser + 10 Tr. Opium (1 Tr. = 0,054 ccm)	53,15
10 „ „ „ + 10 „ „ + 1 Tr. ½ äq. Na_2CO_3	58,2
10 „ „ „ + 10 „ „ + 3 „ ½ „ „	58,1
Bei Zusatz weiterer 10 Tr. Opium	62,2
10 ccm dest. Wasser + 10 Tr. Opium + 3 Tr. ½ äq. Pyridin	55,2
10 „ „ „ + 10 „ „ + 3 „ ½ „ Nicotin	58,3
10 „ „ „ + 10 „ „ + 3 „ ½ „ Piperidin	58,3
10 „ „ „ + 10 „ „ + 3 „ ½ „ Piperazin	58,1
50 ccm dest. Wasser + 50 Tr. Op. Kaulquappen nach 12 Min. bewegungslos	54,5
50 „ „ „ + 20 „ „ nach 2 Std. bewegungslos	51,1
50 „ „ „ + 20 „ „ + 4 Tr. ½ äq. Na_2CO_3 nach 40 Min. bewegungslos	53,2
50 „ „ „ + 10 „ „ + 2 Tr. ½ äq. Na_2CO_3 nach 80 Min. bewegungslos	51,6
50 „ „ „ + 10 „ „ + 4 Tr. ½ äq. Na_2CO_3 nach 55 Min. bewegungslos	51,9
50 „ „ „ + 10 „ „ + 4 Tr. Menschenpankreas[1]) nach 2 Std. bewegungslos	51,45
50 „ „ „ + 10 „ „ + 10 Tr. Menschenpankreas nach 65 Min. bewegungslos	52,25
50 „ „ „ + 10 „ „ + 25 Tr. Hundeserum nach 2 Std. bewegungslos	53,3

[1]) Den Pankreas und das Hundeserum verdanke ich Herrn Prof. Wohlgemuth, Berlin.

Einige stalagmometrische Versuche mit Pantopon[1]) ergaben folgendes:

		Stalagm. Tropfenzahl
10 ccm einer 1%igen wässerigen Pantoponlös.		52,8
10 „ „ „ „ „	+ 2 Tr. 1% Na_2CO_3	61,8
10 „ „ „ „ „	+ 5 Tr. 1% Na_2CO_3	62,6

Lösung opalescierend.

Nach der Vorschrift der das Präparat herstellenden Fabrik wird vor Zusatz von Alkali zu der Lösung desselben gewarnt. Nach den vorliegenden Versuchen wirkt aber ein sehr geringer Zusatz von Natriumcarbonat in hohem Maße verstärkend auf das Präparat.

Die Versuche mit Pankreas und Opiumtinktur zeigen, daß trotz der Alkalität der Darmsäfte ein Zusatz von etwas Alkali zum Opium nicht ganz gleichgültig ist.

Wenn wir nun zu den allgemeinen Schlüssen übergehen, die nach meiner Ansicht aus den vorliegenden Versuchen sich ergeben, so ist vor allem auf die Tatsache hinzuweisen, daß bei den hier vorliegenden Alkaloidversuchen Stalagmometer (und Viscostagonometer, siehe die folgende Mitteilung) den Tierversuch (Kaulquappen, Daphnien) zu ersetzen imstande sind. Da wo keine oder eine geringe Änderung der Oberflächenspannung durch Natriumcarbonat herbeigeführt wird (Morphin, Scopolamin, Pilocarpin), wird auch die Giftwirkung der Alkaloide durch das Alkalisalz nicht oder entsprechend wenig gesteigert. Dasselbe ist der Fall, wenn das Alkali zu schwach ist, um auf das Alkaloidsalz zu wirken (siehe die Versuche mit Pyridin usw.); in allen anderen Fällen besteht eine Parallelität oder sogar Proportionalität zwischen Oberflächenspannung und Giftverstärkung, die vielleicht eine mathematische Formulierung zuläßt.

Dieser Umstand veranlaßt uns, Stellung zu nehmen zu einer wichtigen Frage: nämlich der Frage der allgemeinen Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes auf biologische Vorgänge.

---

[1]) Vgl. auch meine erwähnte Abhandlung, Kolloidchem. Beihefte, Kapitel über Arzneimittel.

Wollten wir versuchen, etwa die Giftwirkung auf die Kaulquappen proportional der zugesetzten Menge Natriumcarbonat zu setzen, so würden Versuch und Rechnung ganz gewiß nicht übereinstimmen, da die für den Verlauf des Tierversuches maßgebende Oberflächenspannung keineswegs der Natriumcarbonatmenge proportional abnimmt. Ebenso muß aber gefordert werden, daß man beispielsweise bei fermentativen Vorgängen nicht eher den Versuch macht, das Massenwirkungsgesetz anzuwenden, als bis hier und in ähnlichen Fällen Näheres über die Wirkungsart der Fermente usw. bekannt ist[1]).

Der Umstand, daß Oberflächenspannung und Giftwirkung bei den Alkaloidsalzwirkungen parallel gehen, ist auch höchst willkommen als Bestätigung meiner lösungstheoretischen Anschauungen[2]). Ich sehe in diesen Versuchen einen weiteren Beweis für die Bestätigung meiner Annahmen, daß nicht der osmotische Druck, sondern der Haftdruck (die Oberflächenspannung) die treibende Kraft der Osmose ist. Ob hierbei Lipoide mitspielen, ist eine sekundäre Frage[3]). Die Osmose erfolgt auch ohne Anwesenheit von Lipoiden, wenn nur die erforderlichen Haftdruckdifferenzen vorhanden sind.

Theorie der lokalen Wirkungen der Alkaloide.

Beim Einsetzen von Kaulquappen in 1%ige Lösungen der folgenden Alkaloidsalze ergab sich folgendes:

---

[1]) Als ein angängiger Versuch erscheint mir in dieser Beziehung die Theorie von Barendrecht (Zeitschr. f. physikal. Chem. **49**, 456, 1904), obwohl Arrhenius in seiner Immuntheorie das Vorgehen Barendrechts merkwürdig findet.

[2]) Vgl. Arch. f. d. ges. Physiol. **132**, 511, 1910; **140**, 109, 1911.

[3]) Dieser Ansicht bleibe ich trotz der Kritik meiner diesbezüglichen Anschauungen (vgl. Arch. f. d. ges. Physiol. **140**, 123), seitens des Herrn Höber in der neuen Auflage seiner Physikal. Chem. der Zellen und Gewebe. Ich werde meine Theorie der Osmose in einer weiteren „Flut von Abhandlungen immer wieder den vorherrschenden Auffassungen entgegenstellen" (vgl. l. c. S. 231), und vielleicht gelingt es schließlich auch, Herrn Höber von der Unhaltbarkeit der Theorie Overtons und der Verbesserungsfähigkeit der osmotischen Theorie zu überzeugen (siehe meine demnächstige Veröffentlichung im Arch. f. d. ges. Physiol.).

Kaulquappen					
Veratrinchlorhydrat[1]) . . .	im	Mittel	nach	1/2 Min.	tot.
Strychninnitrat	„	„	„	2 „	letzte Zuckungen.
Cocainchlorhydrat	„	„	„	9 „	bewegungslos.
Coniinchlorhydrat	„	„	„	22 „	letzte Zuckungen.
Chininchlorhydrat	„	„	„	50 „	„ „
Physostigminchlorhydrat . .	„	„	„	50 „	„ „
Dioninchlorhydrat	„	„	„	80 „	tot.
Atropinsulfat	„	„	„	4 Std.	„
Pilocarpinchlorhydrat . . .	„	„	„	6 „	und länger lebend.
Scopolaminchlorhydrat . . .	„	„	„	6 „	„ „ „
Morphinchlorhydrat	„	„	„	6 „	„ „ „

Die Lebensdauer in den letzten drei Lösungen wurde nicht genau bestimmt, aber die Kaulquappen in den Pilocarpinlösungen starben zuerst.

Ganz dieselbe Reihenfolge der Alkaloidsalze erhielten wir in bezug auf den Einfluß des Natriumcarbonats auf die Oberflächenspannung und Toxizität.

Bei Morphin und Scopolamin übt das Natriumcarbonat in den untersuchten Konzentrationen überhaupt keinen Einfluß aus, bei Pilocarpin war der Einfluß selbst in einer 1%igen Lösung nur bei größeren Mengen von Natriumcarbonat erheblicher, dann folgte Atropin und alsdann die übrigen Alkaloide[2]).

Bedenken wir, daß unser Organismus in den meisten Organen und auch seinen Säften[3]) alkalisch reagiert, so drängt sich uns die Vermutung auf, daß im wesentlichen die lokale Wirkung der Alkaloide nur oder in erster Linie auf den Alkaligehalt der Organe zurückzuführen ist.

Für diese Ansicht sprechen noch weitere Gründe:

---

[1]) Hierüber sowie über weitere Versuche mit Hydrastin, Hydrastinin, Coniin, Strychnin, Narkotin, Berberin, Hydrochinin usw. wird später Frau Dr. Tschernorutzky weiteres berichten.

[2]) Auch in bezug auf die Systeme Wollviolett, Lecithin, Seife, Pikrinsäure und Benzopurpurin erhalten wir annähernd dieselbe Reihenfolge (vgl. Kolloidchem. Beihefte, l. c.).

[3]) Gerade die vorliegenden Versuche zeigen, daß auch das Blut entgegen den nicht beweiskräftigen Annahmen von Höber (Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe) schwach alkalisch reagiert in Übereinstimmung mit den Ausführungen von Rolley (Münch. med. Wochenschr. 28. Mai 1912). Über die Alkalität der verschiedenen Blute, gemessen nach der hier vorliegenden einfachen Methode, werde ich später berichten.

Wie unsere Versuche mit voller Klarheit erkennen lassen, kommt es in bezug auf die verstärkende Wirkung einerseits auf die Natur und Stärke des Alkalis, andererseits auf die Natur des betreffenden Alkaloides an.

Diese von uns aufgefundenen Tatsachen machen es begreiflich, daß Alkaloidsalze, die durch Alkalien keine oder nur eine geringe Verstärkung erfahren (Morphin, Scopolamin), meist auch keine erheblichere lokalen Organwirkungen entfalten, daß aber die übrigen Alkaloide sich entsprechend dem Alkaligehalt und der Natur des Alkalis in Anbetracht der verschiedenen Empfindlichkeit der Alkaloide gegenüber den Alkalien im Körper an verschiedenen Orten verteilen.

Pilocarpin wird nur an solchen Orten lokal wirken, wo eine größere Menge stärkeren Alkalis vorhanden ist, dahingegen wird Chinin, Cocain usw. seine Wirkung auch an Orten geringerer Alkalität entfalten können. Wo eine saure Reaktion vorhanden ist, wie im Magen, wird man, um eine kräftige Alkaloidwirkung zu entfalten, Alkali zusetzen müssen, und ist es in diesem Sinne bemerkenswert, daß man, wie mir gelegentlich Herr Prof. Albu mitteilte, Atropinverabreichungen im Magen stets in Verbindung mit Natriumbicarbonat verordnet.

Diese Alkaliwirkung, die sich in Richtung einer Befreiung von Alkaloidkationen aus ihrem Salzverbande geltend macht, zeigt, daß keineswegs nur immer eine Umsetzung da im Organismus stattfindet, wo elektronegative Ionen auf elektropositiv geladene Oberflächen treffen, und umgekehrt. Auch an elektropositiven Orten können durch indirekte Wirkung elektropositiv geladene Ionen zur Wirkung kommen, und umgekehrt.

Indem nach unserer Ansicht gewichtige Gründe hiernach dafür sprechen, daß im wesentlichen die Alkaloidwirkung an alkalischen Stellen des Organismus erfolgt, soll damit durchaus nicht behauptet werden, daß nicht auch an elektrisch entgegengesetzt geladenen Orten die Alkaloide zur Abscheidung gelangen können.

Von besonderer Bedeutung erschienen mir nun diese Ausführungen in klinischer Hinsicht.

Die erwähnten Versuche von Laewen lassen keinen Zweifel, daß man bei der lokalen Wirkung von Novocain, Cocain usw. mit weitaus geringeren Mengen als bisher dieselbe Wirkung wie ehedem mit größeren Mengen erzielen kann. Wenn man auch annehmen muß, daß durch den Alkalizusatz lokal die verringerte Alkaloiddosis ebenso giftig wirkt wie die größere Dosis ohne Alkalizusatz, so ist es doch für den Gesamtorganismus gewiß nicht gleichgültig, wie groß die Giftdosis ist, die demselben einverleibt ist.

Versuche, die auf meine Bitte von dem Augenarzte Herrn Dr. med. B. Pollak-Berlin in der hiesigen Silexschen Augenklinik ausgeführt wurden[1]), führten in Übereinstimmung mit den Versuchen von Laewen (siehe w.o.) zu den Ergebnissen, daß die Cocainwirkung durch Zusatz von Natriumcarbonat auch am Auge eher eintritt und länger anhält. Herr Dr. Pollak ermächtigte mich ferner zu der vorläufigen Mitteilung, daß es ihm gelungen sei, mehrfach durch Zusatz von Natriumcarbonat zu Atropinsulfatlösungen Fälle von Iritis mit Verwachsungen zu bessern, bei denen durch vorherige Behandlung mit Atropinsulfat allein keine Besserung erzielt wurde.

Die Versuche lassen mich eine Frage aufwerfen von besonderer klinischer Bedeutung:

Wenn die obige Theorie der Lokalwirkung[2]) richtig ist — und viele Gründe sprechen dafür —, dann ist der Alkaligehalt und die Natur des Alkalis an bestimmten Körperorten maßgebend für die Wirkung der Alkaloide. Es eröffnet sich uns aber alsdann die Aussicht, Alkaloide an Körperstellen wirken zu lassen, wo sie unter gewöhnlichen Umständen nicht oder zu schwach wirken, wenn wir

---

[1]) Da sich gemischte Lösungen nicht halten, und es auch in manchen Fällen sehr auf das Mengenverhältnis von Alkaloidsalz und Natriumcarbonat ankommt, so stellt die pharmazeutische Fabrik des Herrn Dr. Laboschin, Berlin NW., Levetzowstraße, auf meine Veranlassung Tabletten her von Natriumcarbonat und den bekannteren Alkaloiden und ev. auch sterile Lösungen in den notwendigen Mischungsverhältnissen, und ist bereit, für klinische Zwecke Proben gratis abzugeben.

[2]) Es ist beabsichtigt, diese Theorie durch Untersuchung der Wirkung von Organsäften und Extrakten weiter zu prüfen und mittels der Aktivierung der Alkaloide in bezug auf die Oberflächenspannung die Alkalität dieser Säfte und Extrakte zu bestimmen.

nämlich den Alkaligehalt entsprechend der Natur des Alkaloides daselbst steigern. In manchen Fällen, beispielsweise bei Chininsalzen, darf indessen der Alkaligehalt wegen der sonst eintretenden Fällungen nur sehr gering sein.

Es wäre wünschenswert, daß weitere berufene Kliniker nach dieser Richtung Versuche vornehmen. Die Versuche mit Blutzusatz (siehe weiter oben) sprechen dafür, daß man möglicherweise auch bei Erkrankungen, wie Malaria, mit weit geringeren Chininmengen auskommt als bisher, wenn man das Blut vorübergehend mit Natriumcarbonat anreichert. Vorläufige Tierversuche, die in liebenswürdiger Weise Herr Dr. Hans Hirschfeld an Ratten anstellte, zeigten, daß man ohne Schädigung des Organismus größere Quantitäten von Natriumcarbonat intravenös einspritzen kann.

Es ist meine Überzeugung, daß in nicht allzuviel Jahren die meisten Alkaloidsalze klinisch nur noch in Gemischen mit Natriumcarbonat verabreicht werden, und wäre es dringend zu wünschen, daß die Herren Kliniker sich der Bearbeitung dieses gewiß nicht unwichtigen Gebietes zuwenden wollten, und bei der Dosierung von Alkaloidsalzen der Gegenwart von Alkali weit größere Beachtung schenken als bisher. Lehren doch meine Versuche, daß beispielsweise 1 Teil 2%iger Natriumcarbonatlösung, zu 200 Teilen 2%iger Chininchlorhydratlösung gesetzt, die Tropfenzahl von 56,9 auf 62,45 steigert, also eine ganz bedeutende Erhöhung der Giftigkeit hervorruft.

Ebenso ist auf den großen Unterschied der Giftwirkung der freien Alkaloide und Alkaloidsalze zu achten.

Zusammenfassung.

1. In Übereinstimmung mit den Versuchen von Bignon, Gros, Přibram und v. Prowazek wurde durch systematische quantitative Versuche an Kaulquappen und Daphnien gezeigt, daß durch alkalische Salze und Alkalien für zahlreiche Alkaloide eine wesentliche Verstärkung ihrer pharmakologischen und toxischen Wirkung erzielt werden kann.

2. Die Größe dieser verstärkenden Wirkung hängt ab von der Stärke des Alkalis und dessen Menge, so-

wie von der Natur des Alkaloides. Es ergibt sich eine einfache, außerordentlich scharfe Methode zur Bestimmung der Stärke der Basen.

3. Es ergab sich in Übereinstimmung mit meiner Haftdrucktheorie, daß die Änderungen der Toxizität und Oberflächenspannung durchaus parallel gehen. An Stelle des Tierversuches kann danach, soweit die Alkaloide in Betracht kommen, die stalagmometrische oder viscostagonometrische Messung treten.

4. Das Massenwirkungsgesetz gilt nicht für die hier vorliegenden Vorgänge; seine Anwendung auf biologische Vorgänge überhaupt muß mit größerer Vorsicht als bisher geschehen.

5. Die Versuche führen zu einer Theorie der lokalen Wirkung der Alkaloide im Organismus, wonach im wesentlichen die Menge und Stärke des Alkalis und die Natur des Alkaloides über die Art der Alkaloidwirkung an einem bestimmten Orte entscheidet.

6. Die veröffentlichten Versuche sind von erheblicher Bedeutung in klinischer Beziehung, insbesondere eröffnet die unter 5. gegebene Theorie der lokalen Wirkung die Aussicht, daß, wenn man an erkrankten Körperstellen Alkalien zuführt, man in der Lage ist, dort Alkaloide wirken zu lassen, die ohnedies unwirksam oder zu schwach wirksam sind.

7. Der Antagonismus von Pilocarpin und Atropin und ähnliche Antagonismen finden durch die hier veröffentlichten Versuche eine physikalische Deutung.

Über die Wirkung von Natriumcarbonat auf basische Farbstoffe und deren Giftigkeit.

Von

J. Traube.

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 5. Juni 1912.)

Wie in der vorhergehenden Mitteilung erwähnt wurde, hat S. v. Provazek[1]) festgestellt, daß auch die Giftwirkung von Methylenblau, von Neutralrot und Azur durch Zusatz von Natriumcarbonat gegenüber Colchidien (Protozoen) verstärkt wird.

Offenbar handelt es sich auch hier um eine teilweise Spaltung der Farbstoffsalze durch das Alkali.

Nach meiner Veröffentlichung: „Über Oberflächenspannung und Flockung kolloider Systeme" in den Kolloidchem. Beiheften 1912 war nun bei den Farbstoffen im allgemeinen keine derart weitgehende Parallelität zwischen Giftwirkung und Oberflächenspannung zu erwarten, denn es wurde in jener Arbeit gezeigt, daß, sobald beispielsweise beim Nachtblau die Aggregation der Farbstoffteilchen bei Zusatz eines Salzes usw. so groß geworden ist, daß sich der Farbstoff wie eine zweite Phase verhält, die Oberflächenspannung des Wassers überhaupt nicht mehr durch den Farbstoff beeinflußt wird, selbst wenn die Farbstofflösung dem Auge unverändert erscheint. Wegen dieser kolloidaleren Beschaffenheit und der damit verbundenen größeren Aggregationsfähigkeit konnte daher bei den Farbstoffen eine so einfache Beziehung zwischen Oberflächenspannung und toxischer Wirkung wie bei den Alkaloidsalzen um so weniger erwartet werden, als die Teilchengröße in erster Linie die Fähigkeit der Osmose mit beeinflußt. Immerhin aber war es nicht uninteressant, im Anschlusse an die vorhergehende Arbeit einige basische Farbstoffe auf ihr Verhalten

[1]) Vgl. S. 472.

gegenüber Kaulquappen mit und ohne Zusatz von Natriumcarbonat, sowie auf ihr stalagmometrisches Verhalten zu untersuchen.

Die folgende Tabelle gibt hierüber Aufklärung:

Farbstoff	Konzentr. d. Farbstofflösung %	Anzahl d. Farbstoffe ccm	Zugeg. Menge 1%iger Na_2Cl_2-Lös. ccm	Stalagm. Tropfenzahl (Wasser = 49,9 Tr.)	Verhalten der Kaulquappen
Nachtblau	0,10	—	—	—	sofort tot
„	0,04	—	—	54,40	n. 35 Min. letzte Zuckungen
„	0,04	20	0,1	46,00	„ 35 „ „ „
Nilblau	0,10	—	—	53,20	„ 25 „ tot
„	0,10	20	0,4	55,50	„ 25 „ „
Toluidinblau	0,10	—	—	49,80	„ 90 „ noch lebh. Zuck.
„	0,10	20	0,4	49,80	„ 45 „ letzte Zuckung
Malachitgrün	0,10	—	—	53,25	„ 5 „ tot
„	0,10	20	0,5	54,95	„ 5 „ „
„	0,025	—	—	50,80	„ 75 „ Zuckungen
„	0,025	20	0,2	51,50	„ 75 „ tot
Methylenblau	0,20	—	—	50,00	—
„	0,20	20	1,2	50,00	—
„	0,20	20	1,0	50,00	—
„	0,20	20	2,0	50,00	—
„	0,10	—	—	50,00	„ 3 Std. noch Zuckungen
„	0,10	20	0,2	50,00	„ 1 „ „ „
Fuchsin	0,10	—	—	50,20	„ 20 Min. tot
„	0,10	20	0,4	50,20	„ 25 „ „
Rhodamin	0,10	—	—	57,10	„ 25 „ „
„	0,10	20	0,4	58,40	„ 1 Std. noch Zuckungen
Krystallviolett	0,10	—	—	51,80	—
„	0,10	20	0,2	52,40	—
„	0,10	20	1,0	53,80	—
„	0,10	20	2,0	53,40	—
„	0,10	20	—	51,80	„ 2 Min. Zuckungen
„	0,025	—	—	50,60	„ 75 „ letzte Zuckungen
„	0,025	20	0,2	50,95	„ 45 „ tot
Methylgrün	0,10	—	—	50,05	—
„	0,10	20	0,2	50,50	—
„	0,10	20	1,0	51,10	—
„	0,025	—	—	—	„ 3¾ Std. letzte Zuckungen
„	0,025	20	0,2	—	„ 3 „ tot

Aus der Tabelle folgt zunächst, daß die Giftigkeit der Farbstoffe gegenüber Kaulquappen etwa die folgende Reihe bildet:

Giftigkeit: Nachtblau > Krystallviolett; Malachitgrün > Nil-

blau; Rhodamin, Fuchsin > Toluidinblau; Methylgrün > Methylenblau.

Die in diesem Falle ungiftigen Farbstoffe: Toluidinblau, Methylgrün und Methylenblau haben in 0,1 %iger Lösung etwa die Oberflächenspannung des Wassers (Tropfenzahl 49,8 bzw. 50,05 bzw. 50,0, gegenüber Wasser = 49,95). Demgegenüber ist die entsprechende Tropfenzahl für Nachtblau etwa 57, für Krystallviolett 51,8, Malachitgrün 53,25, Rhodamin 57,1, Nilblau 53,2 und Fuchsin 50,2.

Es ergibt sich hieraus die Regel:

Basische Farbstoffe, die die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigen, sind meist gegen Kaulquappen giftiger als solche, die keine Erniedrigung der Oberflächenspannung bewirken.

Diese Regel ist beachtenswert; es ist wünschenswert und beabsichtigt, dieselbe an einem größeren Material zu prüfen.

Die Oberflächenspannung ist somit auch hier einer der wichtigen Faktoren, von denen die Giftigkeit abhängt. Daneben kommt vor allem in Betracht die Teilchengröße und die elektrische Ladung des Farbstoffes, denn bekanntlich diosmieren sauere Farbstoffe weitaus schlechter[1]).

Nach meiner „Theorie des Haftdruckes“[2]) ist die Oberflächenspannung die treibende Kraft der Osmose. Wir haben hier wieder eine Bestätigung meiner diesbezüglichen Anschauungen. Daß die Lipoidlöslichkeit nicht ausschlaggebend ist, folgt schon aus dem Umstande, daß, wie selbst Herr Höber[3]), der Verteidiger von Overtons Theorie, zugeben muß, daß Malachitgrün lipoidunlöslich ist.

Bemerkenswert ist es nun, daß die Giftigkeit namentlich von solchen Farbstoffen, die an sich relativ ungiftig sind (Methylenblau, Toluidinblau, Methylgrün), durch Zusatz von Natriumcarbonat verstärkt wurde. Hierher gehört allerdings auch Krystallviolett. Dahingegen wurde bei den anderen an sich giftigen Farbstoffen, wie Nachtblau, Nilblau, Malachit-

---

[1]) Hierüber wird Frau Dr. Tschernorutzky einige Versuche anstellen.

[2]) Siehe u. a. Arch. f. d. ges. Physiol. **182** u. **140**.

[3]) Höber, diese Zeitschr. **20**, 65, 1909, und Ruhland, ebenda **22**, 409, 1909.

grün und Fuchsin, keine Verstärkung der Giftigkeit durch den Alkalizusatz, bei Rhodamin sogar eine Abschwächung beobachtet. Daß bei diesen Änderungen der Giftigkeit die Oberflächenspannung nicht der allein ausschlaggebende Faktor ist, folgt aus dem Umstande, daß außer bei Fuchsin gerade bei Methylgrün, Methylenblau und Toluidinblau trotz Änderung der Giftigkeit keine Änderung der Oberflächenspannung beobachtet wurde, während umgekehrt außer Krystallviolett bei Nilblau, Malachitgrün, Rhodamin und Nachtblau trotz Änderungen der Oberflächenspannung keine Änderungen der Giftigkeit festgestellt werden konnten. Nach meiner soeben in den Kolloidchem. Beiheften erfolgten Veröffentlichung über Oberflächenspannung und Flockung kolloider Systeme können wir uns hierüber nicht wundern, denn neben der die osmotische Geschwindigkeit beeinflussenden Oberflächenspannung spielt in bezug auf die Osmose und damit die Giftigkeit, wie erwähnt, in erster Linie die Teilchengröße eine Rolle.

Das Viscostagonometer. Methoden zur Bestimmung der Oberflächenspannung, Reibung und Adsorption.

Von

J. Traube.

(Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 5. Juni 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Neben den physikalisch-chemischen Methoden zur Bestimmung des Gefrierpunktes und des elektrischen Leitvermögens haben in neuerer Zeit in den biologischen Wissenschaften besonders die Methoden zur Messung der Oberflächenspannung, der Reibung und der Adsorption in den Laboratorien Eingang gefunden.

Der einfache Tropfapparat, das Stalagmometer, hat entsprechend meinem Hinweise in dieser Zeitschrift[1]) schnell eine sehr erhebliche Verbreitung gefunden.

Wenn ich nun mit einem neuen, einfachen Apparate heraustrete, auf den ich gelegentlich in einer Anmerkung schon hinwies[2]), dem Viscostagonometer[3]), so geschieht dies, weil dieser einfache Apparat doch mancherlei Vorteile bietet.

Derselbe ermöglicht:

1. Eine gleichzeitige Messung von Oberflächenspannung und Reibung.

2. Es sind sehr geringe Flüssigkeitsmengen erforderlich; 0,5 ccm und weniger genügen.

3. Die Zeitdauer einer Bestimmung der Oberflächenspannung oder Reibung beträgt kaum mehr als 3 Minuten.

---

[1]) J. Traube, Die Bedeutung der stalagmometrischen Methode. Diese Zeitschr. **24**, 341, 1910.

[2]) Vgl. auch Handb. d. Biochem. Arbeitsmethoden. Kapitel: Capillaranalyse.

[3]) Zu beziehen von der Firma C. Gerhardt in Bonn.

4. Die Genauigkeit in der Messung der Oberflächenspannung ist ebenso groß wie diejenige, die mit Hilfe des Stalagmometers erreicht wird.

Der einfache Apparat ist in beistehender Figur (Fig. 1) abgebildet.

Der Apparat besteht im wesentlichen aus einer geteilten Skalenröhre *a*, welche unten in eine enge Capillarröhre *b* ausläuft, die wiederum in der Abtropffläche *c* endigt.

Mit Hilfe der Pumpe wird die Röhre mit Flüssigkeit gefüllt und man bestimmt zur Messung der Oberflächenspannung direkt die Zahl der Skalenstriche, die einem oder mehreren Tropfen 1. der zu untersuchenden Flüssigkeit, 2. des Wassers entsprechen. Dieses Verhältnis ist direkt proportional dem Verhältnisse der capillaren Steighöhen. Damit man beim Herabfallen des ersten Tropfens gleichzeitig den fallenden Tropfen beobachten und den entsprechenden Teilstrich am oberen Ende der Skalenröhre ablesen kann, wird — auf Verlangen — ein Stativ beigegeben mit zwei rechtwinklig zueinander stehenden Spiegeln, die das Bild des fallenden Tropfens im oberen Spiegel widerspiegeln. Man sieht hierbei scharf auf die Skala und erkennt, indem man ein wenig nach dem Spiegel hinschielt, leicht die Reflexe des fallenden Tropfens.

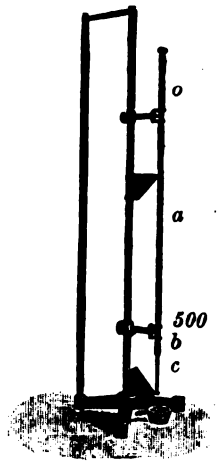


Fig. 1.

Indessen ist das den Apparat verteuernde Spiegelstativ im allgemeinen entbehrlich. Ist die Flüssigkeit nicht zu wertvoll, so verfährt man einfach so, daß, während man oben den Skalenstrich abliest, bei dem der erste Tropfen abfällt, den Moment dieses Fallens mit Hilfe des Fingers feststellt, den man unter die Abtropffläche hält. Will man in besonderen Fällen den hiermit verbundenen geringen Flüssigkeitsverlust vermeiden, so begnügt man sich mit der Zählung von 2 bis 3 Tropfen, die man nun in der Nähe des unteren Endes der Röhre abtropfen läßt. Es genügen also ev. sogar 2 bis 3 Tropfen Flüssigkeit zur Messung der Oberflächenspannung.

Die Tropfengröße ist leicht bis auf 0,1 % genau zu

bestimmen; die Genauigkeit steht also derjenigen der stalagmometrischen Messung keineswegs nach.

Die Reibungskonstante wird nach bekanntem Prinzip in der Weise gemessen, daß man für die betreffende Flüssigkeit wie für Wasser bei der gleichen Temperatur die Ausflußzeit von Teilstrich 0 bis 500 bestimmt. Das mit 100 multiplizierte Verhältnis ist dem der spezifischen Zähigkeit gleich. Da die Reibung von der Temperatur mehr beeinflußt wird als die Oberflächenspannung, so kann man, wenn es sich um sehr genaue Messungen handelt, die Skalenröhre mit einem Mantel nach Art des Liebigschen Kühlers nebst Thermometer versehen. Indessen wird man im allgemeinen hiervon absehen können, sofern nur für verschiedene Zimmertemperaturen die Ausflußzeit des Wassers ein für allemal bestimmt wird.

Man hat wegen der Feinheit der unteren Capillarröhre bei der Bestimmung der Reibung nur darauf zu achten, daß die Flüssigkeit keine festen Partikeln enthält und daß der Flüssigkeitsfaden nicht durch Luftblasen unterbrochen ist.

Was die Methoden zur Bestimmung des Adsorptions- oder Teilungskoeffizienten betrifft, so liegen hier keine Schwierigkeiten vor, soweit es sich um gelöste Säuren oder Basen oder allenfalls auch Salze handelt. Dahingegen sah man von der Bestimmung der Verteilung von indifferenten organischen Stoffen, wie Alkohol, Äther, Ester, Ketone usw., bisher ab, weil hier analytische Schwierigkeiten vorlagen. Da es sich hier aber meist um capillaraktive Stoffe handelt, so ist nichts leichter als eine Bestimmung der Verteilung zwischen zwei flüssigen oder einer festen und einer flüssigen Phase mit Hilfe der Meßmethoden der Oberflächenspannung. Man mißt einfach die Oberflächenspannung der wässerigen Phase vor und nach der Verteilung. Ist die zweite Phase, wie etwa Benzol in Wasser, ein wenig löslich, so wird eine kleine Korrektur angebracht.

Die Adsorption und Verteilung von Giften, namentlich giftigen Salzen, wie KJ, KCNS, $KClO_3$, KNO_3, $HgCl_2$, $AgNO_3$ usw., sowie von sonstigen Giften, wie den Alkaloidsalzen, kann man mit außerordentlicher Schärfe bestimmen durch Messungen der Oberflächenspannungen, wenn man Farbstoffe, wie Nachtblau (basisch), sowie Wollviolett (sauer) als Aktivatoren verwendet. In einer umfassenden Mitteilung in den Kolloidchem.

Beiheften: Über Oberflächenspannung und Flockung kolloider Systeme, Beitrag zur Theorie der Gifte, Arzneimittel und Farbstoffe, habe ich gezeigt, daß man beispielsweise an der Änderung der Oberflächenspannung von Nachtblaulösungen noch $^1/_{2\,000\,000}$ Teil $HgCl_2$ nachweisen kann und in gleicher Weise mit Hilfe von Wollviolettlösungen noch etwa $^1/_{2\,000\,000}$ Teil Cocain, Aconitin, Chinin usw.

Setzt man daher vor und nach dem Schütteln mit der zweiten Phase die betreffende Giftlösung zu der Farbstofflösung, so ist eine sehr genaue Bestimmung der Konzentrationsänderung möglich[1]).

Messungen von Adsorptions- und sonstigen Teilungskoeffizienten, sowie auch zahlreiche Bestimmungen von Löslichkeiten sind daher meist am besten und genauesten durch Messungen von Oberflächenspannungen zu bewirken, so daß auch nach dieser Richtung die Tropfmethoden von Bedeutung sind. Ebenso sind dieselben biologisch schon mit Erfolg verwertet bei allen denjenigen chemischen wie physikalischen Umsetzungen (Lipolyse, Meiostagminreaktion usw.), bei denen erheblichere Änderungen der Oberflächenspannung eintreten.

[1]) Vgl. hierüber meine Ausführungen im Handbuch der Biochem. Arbeitsmethoden, Kapitel: Capillaranalyse.

Autorenverzeichnis.

Bach, A. und V. Maryanovitsch. Zur Kenntnis der Spezifitätserscheinungen bei der Phenolasewirkung. S. 417.

Barbieri, Pietro, siehe Pighini. II.

Bardach, Friedrich, siehe Ditz und Bardach.

Bauer, J. und St. Engel. Studien über das Fibrinogen. I. S. 399.

Bing, H. J. und V. Ellermann. Ein Phosphatid als Aktivator für Tuberkulin. S. 289.

Caesar, Heinrich. Quantitative Untersuchung der Toxizitätsänderung des Morphins bei Kombination mit anderen Opiumalkaloiden. S. 316.

Cruickshank, J. und T. J. Mackie. Über Änderungen der Komplement-Komponenten (Mittelstück und Endstück) durch die Einführung von Lecithin in komplementhaltiges Serum. S. 414.

Csonka, F. v., siehe Edelstein und Csonka.

Ditz, Hugo und Friedrich Bardach. Über die Bestimmung von Phenol und Parakresol in ihren Gemischen. S. 347.

Edelstein, F. und F. v. Csonka. Die qualitative und quantitative Bestimmung flüchtiger Fettsäuren mittels der Vakuum-Dampfdestillation. S. 372.

Ellermann, V., siehe Bing und Ellermann.

Endler, Josef. Über den Durchtritt von Salzen durch das Protoplasma. I. S. 440.

Engel, St., siehe Bauer und Engel.

Fridericia, L. S. Erklärung der Versuchsergebnisse von Chauveau über die Minderwertigkeit der Fette Kohlenhydraten gegenüber als Energiespender bei Muskelarbeit. S. 393.

Heide, C. von der u. E. Schwenk. Über die Bildung von flüchtigen Säuren durch Hefe bei Umgärungen von Weinen. S. 281.

Hidding, Hubert, siehe Murschhauser und Hidding.

Iwanoff, N., siehe Palladin und Iwanoff.

Jegorow, M. A., Zur Kenntnis der Eigenschaften des Phytins. S. 432.

Kerb, Johannes und Paul Lazarus. Zur Frage des Abbaues von Mononatriumurat unter dem Einfluß von Radiumemanation bzw. Radium D. S. 82.

Lazarus, Paul, s. Kerb und Lazarus.

Loewe, Siegfried. Zur physikalischen Chemie der Lipoide I. S. 150. II. S. 190. III. S. 205. IV. S. 207.

Mackie, T. J., s. Cruickshank und Mackie.

Malarski, H. und L. Marchlewski siehe Marchlewski.

Marchlewski, Studien in der Chlorophylgruppe XVI. S. 219.

Maryanovitsch, V., siehe Bach und Maryanovitsch.

Mondschein, Julius, Quantitative Bestimmung der Milchsäure neben β-Oxybuttersäure. S. 91.

— Über die quantitative Bestimmung von Milchsäure bei Gegenwart von Eiweißkörpern. S. 105.

Murschhauser, Hans. Ein Respirationsapparat. S. 262.

Murschhauser, Hans u. Hubert Hidding. Über den Einfluß

trockener und feuchter Luft auf den Gasstoffwechsel. S. 357.
Nizzi, Flammio, siehe Pighini III.
Paladino, Raffaele. Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Blutserums und des Harns von Hunden nach Schilddrüsenexstirpation. S. 302.
Palladin, W. und N. Iwanoff. Zur Kenntnis der gegenseitigen Abhängigkeit zwischen Eiweißabbau und Atmung der Pflanzen. II. S. 325.
Pighini, Giacomo. Chemische und biochemische Untersuchungen über das Nervensystem unter normalen und pathologischen Bedingungen. I. S. 124. — und P. Barbieri, II. S. 137. — und F. Nizzi, III. S. 145.
Pott, Paul. Die wirksame Substanz des Opiumrauches. S. 67.
Reach, Felix. Untersuchungen über die Beziehung der Geschlechtsdrüsen zum Kalkstoffwechsel. S. 59.
Reinhard, A., siehe Zaleski und Reinhard.
Ritter, G. E. Über das Verhältnis der Schimmelpilze zum Rohrzucker. S. 1.
Röhmann, F. und T. Shmamine. Über komplexe Verbindungen von Ferrosalzen, Wasserstoffsuperoxyd und Eiweißstoffen, ein Beitrag zur Frage nach der Beteiligung des Eisens an biologischen Oxydationen. S. 235.
— Zur Kenntnis der Verbindungen von Ferrisalzen mit Albumosen. S. 250.
Rosenfeld, Georg. Über Glykogenbildung. S. 403.
Rosenthal, Felix. Zur Kenntnis der hämolytischen Komponente spermotoxischer Immunsera. S. 7.
Schultz, J. H. Untersuchungen betreffend das Vorkommen eines cholesterinspaltenden Fermentes in Blut und Leber. S. 255.
Schumm, O. Die messende Spektroskopie und die Spektrophotographie als Methoden zur qualitativen Bestimmung des Oxyhämoglobins und seiner Umwandlungsprodukte. S. 304.
Schwenk, E., siehe von der Heide und Schwenk.
Shmamine, F., siehe Röhmann F. und T. Shmamine.
Székely, S. Über die Fettbestimmung nach dem Prinzip der direkten Verseifung. S. 412.
Traube, J. Über die Wirkung von Basen und basischen Salzen auf Alkaloidsalze. S. 470.
— Über die Wirkung von Natriumcarbonat auf basische Farbstoffe und deren Giftigkeit. S. 496.
— Das Viscostagonometer. Methoden zur Bestimmung der Oberflächenspannung, Reibung und Adsorption. S. 500.
Wilenko, G. G. Über den Einfluß des Adrenalins auf den respiratorischen Quotienten und die Wirkungsweise des Adrenalins. S. 44.
Zaleski, W. und A. Reinhard. Zur Frage nach dem Alkoholverbrauch bei der Pflanzenatmung. S. 39.

CHEMISTRY LIBRARY

3 2900 013 063 260
CHEMISTRY LIBRARY
JOURNAL
Does Not Circulate

ALF Collections Vault
3 0000 091 476 527